

MODIFICACIONES DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA PROVOCADAS POR AMINOÁCIDOS NO NEUROTRANSMISORES Y SU PAPEL EN PROCESOS DE NEUROTOXICIDAD

Departamento de Farmacología y Terapéutica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Memoria presentada para optar al Título de Doctor por

Javier Gutiérrez Luengo

Directores:

Jesús Miguel Hernández Guijo

José María Solís Torralba

Madrid, 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar al Dr. José María Solís, “Jota”, por su guía constante y el enorme aprendizaje que he realizado gracias a él y a su infinita paciencia. Aprendizaje tanto en el plano científico como vital en las incontables conversaciones de cafetería y en los imprescindibles seminarios de los viernes junto al Dr. Julián Bustamante y Jose Barbado, además de los invitados ocasionales. En definitiva gracias por hacer esta tesis realidad.

Al Dr. Jesús Hernández Guijo por darme la oportunidad de descubrir lo que es la investigación, por su guía y apoyo durante estos ya casi 6 años desde que comencé este largo recorrido con el Máster en Investigación Farmacológica.

A José Barbado por todo el buen trabajo realizado y los buenos momentos pasados, así como sus inestimables enseñanzas sobre lo que significa el trabajo bien hecho y encontrar solución a cada problema que iba surgiendo

A la Dra. M^a Dolores Muñoz, “Lili”, por toda la ayuda y consejo en estos años, por el trabajo que ha dedicado al desarrollo de esta tesis doctoral, por su alegría contagiosa y especialmente por haber conseguido enseñarme a analizar los pares de pulsos.

A los doctores Rafael Martín del Río y Antonio Sánchez Herranz como a Amparo y M^a José Asensio por todo el tiempo y trabajo dedicado en una parte tan importante como ha sido la cuantificación de aminoácidos.

A la Dra. Diana Reimers por su trabajo y dedicación en las técnicas histológicas de esta tesis doctoral así como enseñarme a comprender un poco mejor este campo tan interesante. Este trabajo ha sido posible también gracias a la colaboración de Silvia Sacristán y el trabajo de Miriam.

A la Dra. Eulalia Bazán, “Lali”, por todos los consejos y las interesantes conversaciones mantenidas durante las comidas.

A José Manuel Ibarz por toda la ayuda prestada durante estos años y por la buena disposición que siempre tuvo para ofrecerla.

Al Dr. José Carlos González por todo el trabajo aportado en el desarrollo de esta tesis y por su junto a la Dra. Elisa Albiñana mis primeros mentores en el laboratorio.

Al resto de compañeros de pasillo, tanto los que están como los que se fueron, por hacer tan agradable mi estancia durante todos estos años.

Especial mención a mi compañero de laboratorio más duradero y compañero también en el Instituto Teófilo Hernando. Al futuro doctor Andrés Mateo Baraibar, “Ander”, por

hacer más agradable las largas jornadas de investigación, por ayudarme siempre que se lo he pedido y sobre todo por mostrarme cómo reaccionar de una manera calmada y serena cuando los experimentos no quieren funcionar.

Además del hospital Ramón y Cajal, el departamento de Farmacología y Terapéutica y especialmente el Instituto/Fundación Teófilo Hernando (IFTH) han sido parte fundamental en mi formación desde el primer momento que entre en contacto con este mundo de la investigación. Agradecerlos sinceramente la oportunidad que me han dado de desarrollarme como investigador y todos los medios que han puesto para ello. Así como agradecer al Ministerio de Educación Cultura y Deporte por la financiación a través de la beca FPU que han realizado para el desarrollo de mi tesis doctoral.

A mis compañeros del Máster en Investigación Farmacológica, donde todo esto empezó, a María, Ricardo, Jose Luis, Elisa, a mi también compañero de facultad y conciertos Pedro y al resto. Especial mención a Rocío Lajarín por toda la ayuda y el apoyo que me ha brindado durante todos estos años que hemos estado embarcados en el proceso de hacernos doctores, además de las reuniones ocasionales pero imprescindibles del CCF junto a los demás miembros ilustres.

Al resto de compañeros del IFTH, tanto los que siguen como los que se han marchado en estos años, con los que he aprendido mucho en los numerosos seminarios de datos y en los ocasionales congresos o cursos que he asistido, pero que sobre todo he disfrutado en su compañía.

No quiero olvidarme tampoco de agradecer a mis amigos de la memorable XXX graduación de Farmacia de la Universidad de Alcalá y a mis amigos y familia del insigne pueblo, referente cultural de esta comunidad, Villarejo de Salvanes. Por estar ahí cuando los necesitaba.

Pero todo este trabajo está especialmente dedicado,

A mis tíos Jose y Victoria, que son como unos segundos padres para mí y nunca podré agradecerles todo lo que han hecho y siguen haciendo por mí.

A mis “hermanos”, Carlos e Isabel, que son una parte fundamental de mi vida.

Y sobre todo a mis padres Julián y Visitación, que me lo han dado todo en esta vida. Muchas gracias por estar siempre ahí.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PROPIEDADES DE LA TAURINA	2
1.2. TAURINA Y SU INFLUENCIA SOBRE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA	4
1.3. POTENCIACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA PRODUCIDA POR OTROS AMINOÁCIDOS	6
1.4. TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS	7
1.4.1. SLC1	12
1.4.1.1. ASCT2	12
1.4.2. SLC6	13
1.4.2.1. GAT1	13
1.4.2.2. GAT2	14
1.4.2.3. GAT3	14
1.4.2.4. GLYT	15
1.4.2.5. TAUT	15
1.4.3. SLC7	15
1.4.4. SLC36	16
1.4.4.1. PAT1	16
1.4.4.2. PAT2	17
1.4.5. SLC38	18
1.4.5.1. SNAT1	18
1.4.5.2. SNAT2	19
1.4.5.3. SNAT3	20
1.4.5.4. SNAT5	20
1.5. HIPOXIA/ISQUEMIA	21
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS RODAJAS	30
3.2. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	32
3.2.1. Cámara de Registro	32

3.2.2.	Registros de los potenciales extracelulares provocados.....	33
3.2.3.	Registros de los potenciales intracelulares	35
3.2.4.	Protocolos de estimulación	36
3.2.5.	Análisis de las señales electrofisiológicas.....	36
3.3.	ANÁLISIS DE LOS AMINOÁCIDOS	38
3.4.	TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	39
3.4.1.	Procesamiento y fijación del tejido	40
3.4.2.	Tinción histológica	40
3.4.3.	Inmunohistoquímica.....	40
3.5.	SOLUCIONES DE PERFUSIÓN	41
3.6.	PROCESAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
4.	RESULTADOS	47
4.1.	AMINOÁCIDOS Y TRANSMISIÓN SINÁPTICA	48
4.1.1.	Efecto sobre la transmisión sináptica de algunos compuestos que son sustratos o no del PAT1.....	48
4.1.2.	Efecto de los aminoácidos sobre la respuesta postsináptica y la excitabilidad axonal	54
4.1.3.	Efecto de la aplicación de los aminoácidos sobre la eficacia sináptica....	58
4.1.4.	Efecto de la aplicación de aminoácidos sobre la liberación de glutamato	63
4.1.5.	Efecto de la aplicación de aminoácidos sobre las propiedades intrínsecas de la membrana neuronal.....	65
4.1.6.	Cantidad de los aminoácidos acumulados en la rodaja y su relación con el efecto de potenciación sináptica	67
4.2.	AUMENTO DEL VOLUMEN CELULAR INDUCIDO POR LA ACUMULACIÓN DE AMINOÁCIDOS	71
4.2.1.	Aplicación de los aminoácidos en un medio hiperosmótico.....	71
4.2.2.	Estudio de los cambios en la resistividad del tejido producido por aminoácidos.....	79
4.2.3.	Efecto de los aminoácidos sobre el fEPSP, el FV y la resistividad en ausencia del anión cloruro del medio	81
4.3.	MEZCLAS DE AMINOÁCIDOS Y TRANSMISIÓN SINÁPTICA	85
4.3.1.	Mezcla de aminoácidos extracelulares	85

4.3.2.	Mezcla de aminoácidos plasmáticos	87
4.3.3.	Comparación de las mezclas de aminoácidos plasmáticos potenciadores y no potenciadores	91
4.4.	EFFECTO DE LAS MEZCLAS DE AMINOÁCIDOS EN PROCESOS DE HIPOXIA	95
4.4.1.	Hipoxia y mezcla Plasma.....	95
4.4.2.	Hipoxia y mezcla Plasma1.....	98
4.4.3.	Cambios histológicos producidos tras la depresión duradera del fEPSP después de un periodo de hipoxia	106
4.4.4.	Hipoxia y medio hiposmótico	109
5.	DISCUSIÓN	114
5.1.	INCREMENTO DE LA EFICACIA SINÁPTICA Y DE LA EXCITABILIDAD AXONAL POR AMINOÁCIDOS	115
5.2.	TRANSPORTADORES IMPLICADOS EN LOS PROCESOS DE POTENCIACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA Y EXCITABILIDAD AXONAL.....	119
5.3.	EL INCREMENTO DE VOLUMEN CELULAR ES UNO DE LOS PRINCIPALES RESPONSABLES DE LA POTENCIACIÓN SINÁPTICA Y AXONAL	123
5.4.	LOS AMINOÁCIDOS DEL PLASMA AUMENTAN LA EFICACIA SINÁPTICA Y LA EXCITABILIDAD AXONAL	125
5.5.	LA MEZCLA DE AMINOÁCIDOS EXACERBA EL EFECTO DELETEREO DE LA HIPOXIA	126
5.6.	INFLUENCIA DEL AUMENTO DEL VOLUMEN CELULAR EN EL DAÑO CAUSADO POR LA HIPOXIA Y LOS AMINOÁCIDOS	130
6.	CONCLUSIONES	132
7.	BIBLIOGRAFÍA	134

ABREVIATURAS

D- o L-Ala: D- o L-alanina

ANOVA: Análisis de la varianza

L-Arg: L-Arginina

ASCT2: Transportador de alanina, serina y cisteína 2

L-Asp: L-Aspartato

L-Asn: L-Asparragina

AP5: Ácido 2-amino-fosfo-pentanoico

Bet: Betaína

CA1: Cornu Ammonis 1

CA3: Cornu Ammonis 3

L-Cys: L-Cisteína

EEM: Error estándar de la media

fEPSP: Potencial postsináptico excitador de campo

FV: Potencial de fibra

GABA: Ácido- γ -amino butírico

GAT (1-3): Transportadores de GABA (1-3)

GES: guanidinoetilsulfonato

L-Glu: L-Glutamato

L-Gln: L-Glutamina

Gly: Glicina

GlyT (1-2): Transportador de glicina (1-2)

β -GPA: Ácido β -guanidinopropiónico

L-His: L-Histidina

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

L-Iso: L-Isoleucina

KRB: Solución de Krebs Ringer bicarbonato

L-Leu: L-Leucina

LLP_{tau}: Potenciación duradera provocada por taurina

L-Met: L-Metionina

MK-801: 5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d] ciclohepteno-5,10-imino maleato

NeuN: Proteína del núcleo neuronal

NGS: suero normal de cabra

NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico

OPA: Orto-ftalaldehído

PAT (1-2): Transportador de aminoácidos acoplado a protones (1-2)

PBS: tampón fosfato

L-Phe: L-Fenilalanina

PPF: Facilitación por pares de pulsos

D- o L-Pro: D- o L-Prolina

Rin: Resistencia de entrada

Sar: Sarcosina

SNAT (1-5): Transportador de aminoácidos neutros acoplados a sodio (1-5)

SNC: Sistema nervioso central

D- o L-Ser: D- o L-Serina

Tau: Taurina

TauT: Transportador de taurina

D- o L-Thr: D- o L-Treonina

L-Trp: L-Triptofano

L-Tyr: L-Tirosina

L-Val: L-Valina

Vm: Potencial de membrana

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROPIEDADES DE LA TAURINA

La taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico) es a diferencia de la mayoría de aminoácidos un β -aminoácido y su grupo ácido no es un carboxilo si no un sulfonilo, encontrándose a pH fisiológico en forma de “zwitterión”. Este es un aminoácido no proteico, es decir que no forma parte de la síntesis de proteína, y está considerado como semi-esencial en el hombre pues, aunque existe una ruta de biosíntesis a partir de la metionina y la cisteína vía cisteínsulfinatodescarboxilasa (Huxtable, 1992; Tappaz, 2004; Ripps y Shen, 2012), la principal fuente de taurina es su ingesta través de la dieta, de carnes y pescados especialmente.

La taurina se encuentra presente en prácticamente todos los tejidos del organismo, siendo probablemente el aminoácido en forma libre más abundante (Sebring y Huxtable, 1986), aunque está especialmente enriquecido en tejidos excitables como el corazón, tejido muscular, glándulas secretoras, cerebro y retina, donde los niveles de taurina llegan hasta 60-80 mM (Huxtable, 1992). En el Sistema Nervioso Central (SNC) es uno de los aminoácidos en forma libre más abundante junto a glutamato (Huxtable, 1989). En el SNC la taurina se encuentra en todos los tipos celulares, en hipocampo se encuentra tanto en neuronas como en glía (Clements et al., 1989). En las neuronas se encuentra en el soma y en las dendritas, estando menos presente en los axones (Huxtable, 1992; Hackett et al., 2016). También se ha localizado en algunos terminales sinápticos (Clements et al., 1989).

Un elemento fundamental en la localización y el correcto mantenimiento de los altos niveles de taurina intracelulares son los sistemas de transporte para este aminoácido. Su captación es saturable, concentrativa, energía-, Na^+ - y Cl^- -dependiente y se produce tanto por parte de las neuronas como de la glía (Saransaari y Oja, 2008). El transporte activo del aminoácido tiene dos componentes, uno de alta y otro de baja afinidad (Kontro y Oja, 1978; Hanretta y Lombardini, 1987), cuyas afinidades se mueven en el rango de micromolar a milimolar respectivamente.

Respecto al transporte de alta afinidad se ha conseguido identificar al transportador TauT (SLC6A6) en varias especies como el perro, ratón, rata o humano (Uchida et al., 1992; Smith et al., 1992; Liu et al., 1992; Ramamoorthy et al., 1994). Este es un transportador de alta afinidad y poca capacidad que como ya se ha mencionado depende de sodio, cloruro y energía para su funcionamiento. Se encuentra ubicuamente localizado en el SNC, además de en otros muchos tejidos, y muestra una gran especificidad por los β -aminoácidos (Liu et al., 1992; Smith et al., 1992). Su funcionamiento cuenta con una estequiometría de entrada de dos moléculas de sodio y una de cloruro por cada molécula de aminoácido, muy parecida a la que muestran los transportadores de GABA, GAT (Alexander et al., 2015), junto a los que pertenece a la gran familia de transportadores SLC6. Precisamente dentro de estos transportadores GAT, el GAT2 es uno de los transportadores candidatos a ser responsable del transporte de baja afinidad de taurina, transporte de baja afinidad que hasta la fecha no cuenta con un transportador plenamente reconocido. Se ha propuesto que el GAT2 ejerza este papel en cerebro e hígado (Zhou et al., 2012; Ikeda et al., 2012). Otro candidato a ser transportador de baja afinidad para taurina es el transportador de aminoácidos acoplado a protón 1 (PAT1) al cual se le relaciona con el proceso de absorción intestinal de taurina (Anderson et al., 2009).

Numerosas funciones se le han atribuido a este aminoácido para explicar su gran presencia en tantas distintas regiones del organismo, aunque no todas han podido ser demostradas. Entre las más destacadas se encontrarían la conjugación de ácidos biliares (Haslewood, 1955), su rol como osmolito orgánico (Solís et al. 1988), el mantenimiento de la homeostasis del calcio (Lombardini 1985) y efectos antioxidantes (Schaffer et al., 2014), así como su capacidad de neuromodulador e incluso se ha propuesto como neurotransmisor aunque sin resultados concluyentes (Oja y Saransaari, 2012). Esto le convierte en un aminoácido esencial para la función cardiovascular, y para el desarrollo y funcionamiento del músculo esquelético, la retina y el SNC (Huxtable, 1992; Sturman, 1993). De hecho, la deficiencia de taurina en las primeras etapas del desarrollo conduce a importantes trastornos de diversos sistemas del organismo, entre ellos el SNC, lo que le convierte en un aminoácido esencial en esta etapa (Sturman 1993). También es necesaria en estados fisiopatológicos donde se

producen disminuciones de los niveles de taurina como cirugía, traumatismos y alimentación parenteral durante largos periodos (Laidlaw y Kopple, 1987; Paauw y Davis, 1990), así como se recomienda su administración en otras patologías como la diabetes (Franconi et al., 1995), la fibrosis quística (Darling et al., 1985) o la hipertensión (Militante y Lombardini, 2002).

De las acciones de taurina sobre la neurotransmisión destaca su capacidad para activar a los receptores de GABA del tipo GABA_A y de glicina aunque con una afinidad menor que GABA y glicina, respectivamente. Taurina es capaz de activar los receptores GABA_A causando una inhibición de la transmisión sináptica debido a la hiperpolarización provocada por el aumento de conductancia al cloruro y por la disminución de la resistencia (Taber et al., 1986; Horikoshi et al., 1988; del Olmo, et al. 2000; Song et al., 2012). Efecto similar provoca al activar los receptores de glicina a unas concentraciones entre 0,2 y 1 mM (Horikoshi et al., 1988; Häusser et al., 1992; Sergeeva y Haas, 2001; Wu y Xu, 2003; Song et al., 2012). Otra propiedad de la taurina relacionada con la neurotransmisión es su capacidad para activar unos receptores NMDA presinápticos atípicos a través de un sitio de unión cercano al de glicina, aunque se muestra incapaz de activar los receptores NMDA postsinápticos (Suárez y Solís, 2006). Este efecto se consigue con concentraciones muy bajas de taurina (EC = 19 μ M) y facilita la excitabilidad del axón.

El trabajo aquí desarrollado ha tomado como base otra propiedad de taurina relacionada con la transmisión sináptica, concretamente su capacidad para provocar cambios en la plasticidad sináptica.

1.2. TAURINA Y SU INFLUENCIA SOBRE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA

En el trabajo de Galarreta et al. (1996) se describió por primera vez que la taurina aplicada a 5-10 mM producía un aumento duradero de la eficacia sináptica y de la excitabilidad axonal por un mecanismo independiente de los receptores GABA, glicina y NMDA, y que no modificaba las propiedades básicas de la membrana aunque

sí producía un aumento del potencial excitador postsináptico intracelular (EPSP). Este efecto ha sido observado también por otros grupos en el hipocampo (Sergeeva et al., 2003; Dominy et al., 2004; Franconi et al., 2004; Yu et al., 2005) y en el estriado (Chepkova et al., 2002; Sergeeva et al., 2003).

Esta potenciación duradera de la transmisión sináptica muestra algunas similitudes con la potenciación a largo plazo clásica (LTP) causada por la aplicación de un tren de estímulos a alta frecuencia (Bliss y Collingridge, 1993). Estas dos formas de plasticidad se ocluyen mutuamente pero no en su totalidad (del Olmo et al., 2000), lo que lleva a pensar que comparten parte de los mecanismos en su funcionamiento. Entre estos puntos en común se encuentran el requerimiento de calcio para ambos procesos y el desencadenamiento de varios mecanismos involucrados en su mantenimiento como la activación de PKA y la síntesis de proteínas de novo (del Olmo et al., 2003). De hecho, taurina muestra un comportamiento cooperativo con la LTP que requiere de concentraciones y tiempos mucho menores que los necesarios para provocar la potenciación por taurina (denominada LLP_{tau}), especialmente cuando se combina con la activación de receptores dopaminérgicos D1 (Suárez et al. 2014). Aunque también hay aspectos que diferencian a la LLP_{tau} de la LTP, como que esta primera es NMDA independiente y provoca el aumento duradero del potencial de fibra.

Otras características de la LLP_{tau} ponen de manifiesto la implicación de los sistemas de transporte para taurina en la génesis del proceso, como ser un proceso dependiente de sodio y de la temperatura, ambos factores que influyen de manera determinante en el funcionamiento de la mayoría de transportadores. Otro punto a favor de la involucración de un sistema de transporte es que este proceso de potenciación es imitado por otros sustratos de los transportadores de taurina como GABA, β -alanina o guanidinoetilsulfonato (GES), pero no por derivados de taurina que no son captados como N-metil-taurina (Galarreta et al., 1996; Suárez et al., 2016). LLP_{tau} es un proceso que depende del tiempo y de la concentración, y necesita de altas concentraciones ($\geq 3\text{mM}$) para producirse, por lo que el transportador que lo medie debería ser de baja afinidad y alta capacidad. Estas características hacen que el transportador específico de taurina, el TauT, tuviera pocas probabilidades de ser el

transportador que mediara en estos efectos potenciadores. Pero además, en un ratón nulo para este transportador no se observaron cambios en el proceso de potenciación producido por taurina en hipocampo, aunque sí impidió la potenciación que produce taurina en el estriado (Sergeeva et al. 2003). Esta potenciación causada por taurina en el estriado muestra algunas diferencias con la provocada en el hipocampo como la dependencia de la activación del receptor de glicina (Chepkova et al. 2002). Aunque no se conoce el transportador que induciría la aparición de estos efectos potenciadores sí se comprobó que el SKF89976A, un antagonista del transportador GAT1, es capaz de bloquear tanto la captación de taurina como su efecto potenciador, sin embargo otro inhibidor selectivo de ese transportador como es el NO-711 era incapaz de revertir el efecto potenciador (del Olmo et al., 2004). Esto nos dice que el SKF 89976A ejercería su efecto bloqueando otro sistema de transporte.

1.3. POTENCIACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA PRODUCIDA POR OTROS AMINOÁCIDOS

Además de taurina se ha descrito que otros aminoácidos son capaces de provocar potenciaciones de la transmisión sináptica. La mayoría causa este efecto, a diferencia que taurina, a través de la activación del receptor NMDA, siendo glicina probablemente el más conocido (Shahiy Baudry, 1993; Musleh et al., 1997; Chepkova et al., 2002) dado que glicina actúa como coagonista del receptor NMDA y que junto a glutamato participa en el proceso de LTP (Watanabe et al., 1992). Glicina no es el único aminoácido que ha demostrado ser coagonista del receptor NMDA, D-serina también muestra esta capacidad y su involucración en los procesos de LTP junto a glutamato. Este efecto de D-serina parece requerir su liberación del astrocito y la participación del sistema de transporte asc1, que funciona como intercambiador de aminoácidos, el cual también comparte con glicina (Henneberger et al., 2010; Rosenberg et al., 2013). Otro aminoácido que es capaz de generar una potenciación a través del receptor NMDA es la L-prolina, que aplicada a concentraciones de micromolar durante 20 minutos es capaz de provocar una potenciación duradera de la transmisión sináptica la cual no se ocluye con la LTP (Cohen y Nadler, 1997).

Glicina también es capaz de provocar la potenciación de la transmisión sináptica cuando los receptores NMDA están inhibidos. La perfusión de glicina 1 mM durante 30 minutos en rodaja de hipocampo provoca una potenciación duradera de la transmisión sináptica que no se ve afectada por la inhibición de los receptores de glicina y que aumenta si se inhiben los receptores NMDA (Igartua et al., 2007). Este efecto de glicina está mediado por la acción de su transportador GlyT1. Otro mecanismo diferente por el que glicina es capaz de provocar un proceso de potenciación de la transmisión sináptica es el que se describe en el colículo superior. Este proceso depende de la concentración aplicada, produciéndose la potenciación con solo la aplicación 0,5 mM de glicina durante 7 minutos (Platt et al., 1998). Esta potenciación a diferencia de la descrita por Igartua et al. (2007) depende de la activación de canales de calcio voltaje-dependientes tipo L. En la misma región también se ha observado que la aplicación de GABA (3-10 mM) causaba una potenciación de la transmisión sináptica por un mecanismo independiente de sus receptores y que requería la entrada de calcio a través de los canales de tipo L (Platt y Withington, 1998; White y Platt, 2001)

1.4. TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS

Los transportadores de aminoácidos son estructuras proteicas que reconocen y transportan aminoácidos, y se encuentran unidos a diferentes membranas como la plasmática, vesicular, mitocondrial, de peroxisomas, lisosomal y del aparato de Golgi. Además de para la síntesis proteica la acción de los transportadores tiene especial relevancia en el sistema nervioso, donde numerosos aminoácidos actúan como neurotransmisores, neuromodulares o precursores de neurotransmisores; y el mantenimiento de unos correctos niveles extracelulares de neurotransmisores así como una suficiente cantidad de precursores intracelulares es de especial importancia. El transporte de aminoácidos se caracteriza porque los transportadores de membrana muestran la capacidad de reconocer diferentes sustratos, en algunas ocasiones gran variedad de ellos, lo que provoca que en células que contienen distintos

conjuntos de sistemas de transporte se produzca un solapamiento en la captación para un mismo sustrato.

Normalmente el transporte de aminoácidos se hace en contra del gradiente del sustrato, por lo que es un transporte activo, que normalmente lleva acoplado el paso de iones para aprovechar el gradiente iónico. Según el número de moléculas y el sentido de estas en su transporte a través de la membrana se pueden clasificar en:

- 1.1 **Uniportadores.** Permiten el paso de un único sustrato a la vez de forma independiente al gradiente iónico. Un ejemplo de estos transportadores son los del sistema γ^+ (Cat1-4) cuando se trata del transporte de aminoácidos catiónicos como arginina donde además del gradiente de sustrato aprovechan el gradiente de voltaje de la célula (Kakuda y MacLeod, 1994; Hyde et al., 2003).
- 1.2 **Cotransportadores (o simportadores).** Realizan el transporte de una o más moléculas de sustrato en contra de gradiente mientras llevan acoplado el transporte de iones a favor de gradiente. El más habitual es el Na^+ , dada su abundancia en el medio extracelular, pero otros como Cl^- , que también es abundante en el medio extracelular, H^+ o OH^- también se pueden ver acoplados, de forma individual o en combinaciones (ver revisiones de Palacín et al., 1998; Bröer, 2002).
- 1.3 **Antiportadores (o intercambiadores).** Transportan el sustrato y/o iones en sentido contrario a otro sustrato y/o iones. Este tipo de transportadores también pueden realizar cotransporte simultáneamente como los transportadores del sistema N, que cotransportan el sustrato junto a una molécula de sodio mientras que expulsan un protón (Chaudhry et al., 2001; Bröer et al., 2002). Dentro de esta categoría también estarían los intercambiadores de aminoácidos, que introducen un sustrato al mismo tiempo que expulsan a otro (Fotiadis et al., 2013).

Los principales tipos de transportadores a través de la membrana plasmática para aminoácidos vienen recogidos en la tabla 1.1 junto a sus principales sustratos, el transporte de iones que llevan acoplados y al sistema al que pertenecen.

El movimiento iónico que se produce acoplado al transporte de aminoácidos o incluso el transporte mismo de aminoácidos cargados puede influir sobre el potencial de membrana (V_m). Cuando el transporte neto de cargas no está balanceado se dice que es un transporte electrogénico, mientras que en el caso contrario cuando no hay un desbalance en el conjunto de cargas transportadas se define como un transporte electroneutro. Además del movimiento de cargas acoplado al transporte muchos transportadores han mostrado la capacidad de actuar como canales iónicos o llevar corrientes iónicas desacopladas al transporte pero que normalmente dependen de sustrato (Palacín et al., 1998).

Dado todo este movimiento de iones un elemento fundamental para el mantenimiento de los gradientes son las diferentes bombas ATPasas que evitan un excesivo acumulamiento de iones a costa de energía. Si estos gradientes se pierden los transportadores muestran la cualidad de actuar en modo reverso, favoreciendo la salida de los aminoácidos sustratos para esos transportadores. Esto se produce por cambios de los gradientes iónicos y de voltaje a los que están asociados, como sucede en el caso del CAT1 o el GlyT1 (Kavanaugh, 1993; Aragón et al., 1988), pero también influye la concentración de sustrato, siendo esto más importante en los transportadores que actúan como intercambiadores. El transporte reverso tiene gran relevancia fisiológica, como sucede en el ciclo de glutamato-glutamina por el cual las neuronas reponen los niveles de glutamato tras la liberación sináptica. En este ciclo la acción de los transportadores del sistema N juega un papel muy importante al mediar la liberación de glutamina desde la glía. En procesos patológicos también muestra gran relevancia este tipo de transporte, especialmente con los transportadores de glutamato, para los cuales se ha demostrado que en fenómenos de hipoxia/isquemia actúan en modo reverso promoviendo un aumento del glutamato extracelular (Barbour et al., 1988; Sánchez-Prieto y González, 1988; Szatkowski et al., 1990; Rossi et al., 2000).

Otra cualidad que muestran los transportadores es la afinidad que tienen por sus diferentes sustratos. Se considera de alta afinidad cuando es capaz de captar al sustrato a concentraciones por debajo de 100 μM y esta captación normalmente, debido a la saturación del transporte, tiene una baja capacidad. Mientras que se

referiría a baja afinidad cuando los transportadores muestran afinidades alrededor de cientos de micromolar o incluso en el rango de milimolar por sus sustratos y su captación se realiza con alta capacidad. Estas últimas características son las que debería tener el sistema de transporte involucrado en el proceso de potenciación producido por taurina. A continuación describo los principales transportadores de aminoácidos que se pueden encontrar en el hipocampo detallando más aquellos que muestran una baja afinidad por sus principales sustratos.

SISTEMA	NOMBRE	SUBSTRATOS	MECANISMO
X^{As}	EAAT1(SLC1A3)	Glu, Asp	$3Na^+/1H^+/AA$ cotransporte/ $1K^+$ antiporte
	EAAT2(SLC1A2)	Glu, Asp	
	EAAT3(SLC1A1)	Glu, Asp, Cys	
ASC	EAAT4(SLC1A6)	Glu, Asp	Na ⁺ -dependiente
	EAAT5(SLC1A7)	Glu, Asp	
	ASCT1(SLC1A4)	Cys, Ala, Ser, Thr	
Y^+	ASCT2(SLC1A5)	Ala, Ser(Isoformas D y L), Cys (baja Vmax), Thr, Gln, Asn	Uniportador
	CAT1(SLC7A1)	Arg, Lys, His	
	CAT2(SLC7A2)	Arg, Lys, His	
L	CAT3(SLC7A3)	Arg, Lys	Antiportador
	4F2hc/LAT1(SLC3A2/SLC7A5)	His, Met, Leu, Iso, Val, Phe, Tyr, Trp, Gln	
	4F2hc/LAT2(SLC3A2/SLC7A8)	Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Leu, Iso, Val, Phe, Tyr, Trp	
Y^{+L}	4F2hc/γ+LAT1(SLC3A2/SLC7A7)	Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu	Uniportador para AAs catiónicos Antiportador
	4F2hc/γ+LAT2(SLC3A2/SLC7A6)	Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu, Ala, Cys	
	b0,+AT(SLC7A9)	Lys, Arg, Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Iso, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp	
b^{0+}	4F2hc/asc1(SLC3A2/SLC7A10)	Gly, Ala, Ser, Thr, Cys (Isoformas D y L)	Antiportador de amplio espectro de aminoácidos catiónicos y neutros
	4F2hc/xCT (SLC3A2/SLC7A11)	Glu, Cysteine	
	GAT1 (SLC6A1)	GABA	
β	GAT2 (SLC6A13)	GABA, β-ala, taurina	$2Na^+/1Cl^-/AA$ cotransporte
	GAT3 (SLC6A11)	GABA, β-ala, taurina	
	BGT1 (SLC6A12)	GABA, betaina	
Gly	Taut (SLC6A6)	β-ala, taurina, GABA	$3Na^+/1(6-2)Cl^-/AA$ cotransporte
	GLYT1(SLC6A9)	Gly, sarcosina	
	GLYT2 (SLC6A5)	Gly	
B^{0+}	ATB ⁰⁺ (SLC6A14)	Lys, Arg, Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Iso, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp	$2-3Na^+/1Cl^-/AA$ cotransporte
	PROT (SLC6A7)	Pro	
	B ⁰ AT1(SLC6A19)	Leu, Met, Iso, Val, Asn, Phe, Ala, Ser, Thr, Gly, Pro	
B^0	B ⁰ AT2(SLC6A19)	Pro, Ala, Val, Met, Leu, Iso, Thr, Asn, Ser, Phe, Gly	$1Na^+/AA$ Cotransporte
	B ⁰ AT3(SLC6A19)	Ala, Gly, Met, Phe, Leu, His, Gln	
	TAT1 (SLC16A10)	Phe, Tyr, Trp	
T	PAT1 (SLC36A1)	GABA, Ala, β-ala, taurina, Cys, Pro(Isoformas D y L), Gly, D-ser, sarcosina	Transporte dependiente de Na^+ y Cl^-
	PAT2 (SLC36A2)	Ala, β-ala, Gly, sarcosina, Pro (Isoformas D y L)	
	PAT3 (SLC36A3)	?	
IMINO	PAT4 (SLC36A4)	Trp, Pro (Isoformas D y L), Gln	Uniportador
	SNA11 (SLC38A1)	Ala, Ser, Gln, Asn, His, Cys, Met, Gly, Thr, Pro, Tyr, Val	
	SNA12 (SLC38A2)	Ala, Met, Asn, Gln, Ser, Pro, Gly, Thr, Leu, Phe	
A	SNA14 (SLC38A4)	His, Asn, Ala, Lys, Gly, Gln, Ser, Pro, Leu, Phe	$1Na^+/AA$ cotransporte
	SNA13 (SLC38A3)	His, Gln, Asn, Ala	
	SNA15 (SLC38A5)	Asn, Ser, His, Gln, Gly, Ala	
N			$1Na^+/AA$ cotransporte / $1H^+$ antiporte

Tabla 1.1. Transportadores de aminoácidos en la membrana plasmática. Datos obtenidos de la guía de Alexander et al. (2015) y de las revisiones de Palacín et al. (1998) y Bröer (2002)

1.4.1. SLC1

La mayoría de transportadores involucrados en la captación de neurotransmisores son de alta afinidad para controlar de manera satisfactoria las concentraciones de neurotransmisores en la hendidura sináptica. Un claro ejemplo son los transportadores para glutamato que pertenecen a la familia SLC1 y transportan con alta afinidad glutamato (2-65 μM) o aspartato junto a tres moléculas de sodio y un protón produciendo al mismo tiempo el antiporte de una molécula de potasio, por lo que son transportadores electrogénicos (Zerangue y Kavanaugh, 1996). Dependiendo del subtipo se encuentran preferentemente en neuronas (EAAT3 y 4) o en astrocitos (EAAT1 y 2), y dependiendo de su localización están involucrados en la regulación de la neurotransmisión excitadora, en el mantenimiento de bajas concentraciones extracelulares de glutamato o en la provisión de glutamato para el metabolismo incluyendo el ciclo glutamato-glutamina. Pese a ser de alta afinidad poseen una buena capacidad acumulativa, especialmente por la alta densidad presente de transportadores de glutamato en el tejido nervioso (Lehre y Danbolt, 1998; Danbolt, 2001), aunque en determinadas ocasiones pueden actuar como intercambiadores (ver revisión Bröer, 2002).

Otros transportadores que pertenecen a la familia SLC1 son los de la subfamilia alanina/serina/cisteína (ASC). Pese a mostrar similitud en su estructura poseen un comportamiento bien diferenciado de los EAAT. El sistema ASC funciona como intercambiador de aminoácidos junto a un intercambio equivalente de moléculas de sodio, por lo que muestra un transporte neutro. Sus principales sustratos son aminoácidos neutros pequeños.

1.4.1.1. ASCT2

El transportador de alanina, serina y cisteína 2 (ASCT2) se encuentra en varios sistemas como el pulmón, el colon o el riñón, además de en el SNC. En el cerebro este transportador se encuentra en las dendritas de las neuronas y en astrocitos (Bröer, et

al. 1999; Ribeiro et al., 2002; Gliddon et al., 2009). Tiene una amplia variedad de sustratos por los que muestra una afinidad elevada como L-glutamina ($K_m \approx 0,1 \text{ mM}$), L-alanina, L-serina y L-treonina (Utsunomiya-Tate et al., 1996; Pingitore et al., 2013), por L-cisteína también muestra una elevada afinidad pero no actúa como sustrato sino como modulador (Scalise et al., 2015). Es capaz también de captar isómeros D pero con menor afinidad como D-treonina o D-serina ($K_m \approx 2,5 \text{ mM}$). Otros aminoácidos por los que muestra también baja afinidad son L-leucina, L-valina, L-metionina y glicina (Utsunomiya-Tate et al., 1996; Gliddon et al., 2009; Pingitore et al., 2013). Para estos sustratos muestra un perfil diferente en su capacidad de captar y liberar, mostrando ambos comportamientos para L-glutamina, asparragina, L-serina y L-treonina, pero solo media la captación de L-alanina, L-valina y L-metionina (Pingitore et al. 2013). Aunque es proclive a mostrar una mejor afinidad para el proceso de captación que para el de liberación (Pingitore et al., 2013). Debido a esto se cree que su función es corregir los desequilibrios en la reserva intracelular de aminoácidos así como participar en la liberación de glutamina para el ciclo glutamina-glutamato (Torres-Zamorano et al., 1998; Bröer et al., 1999; Scalise et al., 2015). También parece implicado en la regulación de los niveles de D-serina en hipocampo (Gliddon et al., 2009; Wang et al., 2017).

1.4.2. SLC6

1.4.2.1. *GAT1*

En la familia de transportadores SLC6 se encuentran los transportadores de alta afinidad de GABA, donde el GAT1 sería el más importante en el control de la neurotransmisión GABAérgica. Este transportador se expresa específicamente en cerebro, se encuentra preferentemente en neuronas y es el transportador GAT que se suele encontrar en las terminales GABAérgicas (Zhou y Danbolt, 2013). Como la mayoría de transportadores de esta familia, GAT1 funciona como un cotransportador

que introduce junto al sustrato dos moléculas de sodio y otra de cloruro, teniendo por tanto un componente electrogénico (Kanner et al., 1989).

1.4.2.2. *GAT2*

Dentro de los transportadores de alta afinidad de GABA es el único que se expresa fuera del SNC, aunque también tiene expresión en este sistema. Dentro del SNC su principal ubicación son las leptomeninges pero también se ha encontrado expresado en baja cantidad a lo largo del cerebro siendo el hipocampo una de estas regiones (Conti et al., 1999; Liu et al., 2015). A nivel neuronal se encuentra principalmente en dendritas y en terminales axónicos, aunque también se puede encontrar en astrocitos (Conti et al., 1999). Respecto a sus sustratos es de los pocos para los que se ha detectado un transporte de baja afinidad de taurina ($K_m \approx 0,5 \text{ mM}$). Esta misma afinidad muestra por el ácido β -guanidinopropiónico (β -GPA por sus siglas en inglés) así como por otros β -aminoácidos (Liu et al., 1993; Ikeda et al., 2012). Entre las funciones que se le otorgan se encuentra la de participar en el control de la composición del líquido cefalorraquídeo por su gran presencia en las meninges, la de ser el mayor responsable del control de los niveles de GABA en tejido periférico y la captación de taurina en cerebro e hígado (Zhou et al., 2012; Ikeda et al., 2012).

1.4.2.3. *GAT3*

Este transportador se encuentra principalmente en cerebro con una localización mayoritaria en astrocitos. En hipocampo y en otras regiones como la corteza también se ha comprobado que se expresa tanto en axón como en soma y dendritas, siendo mayor su importancia en estas últimas, aunque no parece tener una relación directa con las sinapsis sino que tendría una mayor importancia regulando la cantidad de GABA extrasináptico (Ahn et al., 1996; Melone et al., 2015). Muestra un

perfil de sustratos parecido al de GAT2 aunque con una menor afinidad por taurina ($K_m = 1,4 \text{ mM}$)(Liu et al., 1993).

1.4.2.4. *GLYT*

Otro aminoácido neurotransmisor transportado por esta misma familia de transportadores es glicina. El transportador GlyT1 cuya estequiometría es la misma que GAT1 se expresa preferentemente en glía rodeando las sinapsis glutamatérgicas por lo que se le relaciona con el efecto de glicina sobre el receptor NMDA (Bergeron et al., 1998; Gabernet et al., 2004). El transportador Glyt2 introduce una molécula más de sodio que los anteriores y su expresión es mayoritaria en neuronas con un alto contenido en glicina así como de receptores inhibidores de glicina (Zafra et al., 1997).

1.4.2.5. *TAUT*

El transportador de taurina TauT, también pertenece a la familia SLC6. Este transportador se sitúa entre otras regiones del sistema nervioso en el hipocampo, siendo más abundante en la región CA1 y se puede encontrar tanto en neuronas como en glía (Pow et al., 2002). Además de tener una alta afinidad por taurina y β -alanina, muestra una baja afinidad por GABA ($K_m = 1,5 \text{ mM}$) (Tomi et al., 2008).

1.4.3. SLC7

Los intercambiadores de aminoácidos son el tipo de transportador de aminoácidos predominante en mamíferos, dentro de este grupo se encontraría el intercambiador independiente de sodio asc1 que pertenece a la familia SLC7. Este transportador que heterodimeriza con la glicoproteína 4F2hc se encuentra expresado en varios órganos entre los que está el SNC y concretamente se ha encontrado un

intenso marcaje en las células piramidales del hipocampo (Helboe et al., 2003). Muestra una alta afinidad ($K_m \approx 8-24\mu M$) por aminoácidos neutros pequeños como glicina, L-alanina, L-serina, L-treonina y L-cisteína (Fukasawa et al., 2000), y también por sus isómeros D, como D-alanina y especialmente D-serina ($22,8\mu M$), cuya regulación ha mostrado tener importancia en los procesos de potenciación vía NMDA junto a glicina (Nakauchi et al., 2000; Rosenberg et al., 2013).

En el hipocampo también se pueden encontrar los tres transportadores del sistema y^+ que también pertenecen a la familia SLC7 (CAT1-3). CAT1 es el más abundante de los 3 y se expresa tanto en neuronas como en glía (Jäger et al., 2013). Estos transportadores funcionan como uniportadores para aminoácidos catiónicos aprovechando su carga positiva para realizar un transporte facilitado a favor de gradiente de voltaje. En la neurotransmisión su papel más destacado es la captación de arginina que es precursor necesario en la síntesis del óxido nítrico (Verrey et al., 2004; Fotiadis et al., 2013).

1.4.4. SLC36

Los transportadores de aminoácidos acoplados a protón (PAT) pertenecen a la familia SLC36 que se encuentra altamente expresada en intestino y riñón, donde parecen tener un rol importante en la captación de aminoácidos. Funcionan como cotransportadores introduciendo un sustrato junto a un protón, lo que les convierte en unos transportadores electrogénicos y especialmente sensibles a cambios de pH.

1.4.4.1. *PAT1*

Es un transportador muy ubicuo que se encuentra en el SNC, principalmente en la membrana de lisosomas y también en la membrana plasmática de neuronas y axones del hipocampo (Wreden et al., 2003; Agulhon et al., 2003), aunque no se ha observado en glía. Transporta con baja afinidad ($K_m \approx 1-10\text{ mM}$) una amplia variedad

de aminoácidos: pequeños, sin ramificaciones, zwitterionicos, α -, β -y γ -amino e iminoácidos; N-metilados y heterocíclicos conteniendo de 4 a 6 anillos (Chen et al., 2003; Boll et al., 2003; Metzner et al. 2006,2009).PAT1, junto a los ya mencionados GAT2 y GAT3, es el único transportador para el que se ha detectado el transporte de la taurina con baja afinidad. Es destacable que no distingue entre isómeros D- y L-, mostrando afinidades similares para casos como L-prolina y D-prolina o L-alanina y D-alanina, e incluso una mejor afinidad por D-serina respecto a L-serina (Boll et al., 2003; Thondorf et al., 2011). PAT1 es capaz de realizar el transporte de aminoácidos en ambos sentidos dependiendo del voltaje, la concentración del sustrato y del pH, siendo este último un factor clave en su función transportadora y alcanzando su máxima capacidad transportadora a un pH externo de 5,5-6. Esta característica le permite realizar la principal función que se le atribuye en el SNC que sería la liberación de aminoácidos desde los lisosomas (Foltz et al., 2005). También influye en su principal función en el sistema periférico que es la captación de aminoácidos a través de la barrera intestinal, entre los que se encuentra la taurina (Anderson et al., 2009).

1.4.4.2. PAT2

Este transportador tiene una distribución menos amplia que PAT1 pero aun así se muestra en una gran variedad de sistemas, incluido el SNC. Como el PAT1, el PAT2 en el SNC es un elemento fundamentalmente neuronal aunque a diferencia que el anterior no parece localizarse en lisosomas sino en la membrana plasmática y en la membrana del retículo endoplásmico. Respecto a su patrón de expresión también llama la atención que tiene una especificidad neuronal muy semejante a la de la subunidad NR1 del receptor NMDA (Rubio-Aliaga et al., 2004). PAT2 tiene una menor variedad de sustratos que PAT1 aunque muestra mayores afinidades por ellos, por ejemplo sus mejores sustratos que son L-prolina, sarcosina, D-prolina, L-alanina, glicina se mueven en el rango de 0,15 a 0,6 mM, mientras que otros sustratos de más baja afinidad como D-alanina o D-serina están entre 6,5 y 15 mM. Su función aún no ha sido del todo esclarecida, aunque parece tener bastante importancia en el transporte de glicina ya que la mutación que conduce a una menor expresión de este transportador

desencadena iminoglicinuria e hiperglicinuria (Bröer et al., 2008). También podría tener importancia en la regulación de los niveles de glicina en el cerebro no solo por su captación sino también promoviendo su liberación al actuar en modo reverso (Rubio-Aliaga et al., 2004; Kennedy et al., 2005).

1.4.5. SLC38

Dentro de los transportadores de baja afinidad uno de los principales es el grupo que engloba a los transportadores de aminoácidos neutros acoplados a sodio (SNAT). Estos transportadores pertenecen a la familia SLC38, se expresan principalmente en el SNC y se dividen en dos grandes sistemas, el sistema A y el sistema N. El sistema A (SNAT1-2) opera mediante un cotransporte de un sustrato con una molécula de sodio, siendo por tanto electrogénico, tiene como sustrato al ácido 2-metilaminoisobutírico (MeAIB) y es sensible al pH. El sistema N (SNAT3 y 5) lleva acoplado además del cotransporte de sodio un antiporte de un protón lo que le convierte en un transporte electroneutro, muestra una baja afinidad por sus mejores sustratos como glutamina o asparagina y se inhibe profundamente por un bajo pH extracelular pero no por el MeAIB (Mackenzie y Erickson, 2004).

1.4.5.1. SNAT1

El transportador SNAT1 se localiza principalmente en cerebro, retina, placenta y corazón. Dentro del SNC una de las regiones donde se expresa es el hipocampo, donde se encuentra principalmente en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, aunque en otras regiones también ha sido localizado en astrocitos como en los que forman la barrera hematoencefálica o en estructuras como las leptomeninges o el plexo coroideo (Melone et al. 2004). En neuronas se encuentra principalmente en el soma y en las dendritas proximales, mostrándose ausente en los axones y poco expresado en terminales sinápticos in vivo. Este transportador muestra afinidad por aminoácidos

zwitterónicos y alifáticos como L-glutamina o L-alanina ($K_m \approx 0,5 \text{ mM}$) (Albers et al., 2001). La principal función que se le atribuye es su participación en el ciclo glutamina-glutamato donde sería el encargado de la captación de glutamina por parte de las neuronas tanto glutamatérgicas como GABAérgicas.

1.4.5.2. *SNAT2*

Este transportador tiene una distribución más amplia en el organismo que SNAT1 estando presente en prácticamente todos los tejidos. Entre las múltiples regiones del SNC donde se encuentra el hipocampo es una de ellas, donde no se limita a aparecer en soma y dendritas proximales sino que también puede ser encontrado en todo el árbol dendrítico y a lo largo del axón, aunque no parece estar presente en los terminales sinápticos. También está presente en astrocitos, resultando especialmente visible en la barrera hematoencefálica o en las leptomeninges como el SNAT1, aunque a diferencia de éste no se ha encontrado en las neuronas GABAérgicas (González-González et al., 2005). Tiene un perfil de sustratos similar al SNAT1 con L-alanina ($K_m = 0,53 \pm 0,05 \text{ mM}$), L-serina y L-metionina entre sus mejores sustratos aunque a diferencia del SNAT1 L-prolina es un buen sustrato mientras que muestra menor afinidad por L-glutamina ($K_m = 1,65 \pm 0,27 \text{ mM}$) (Yao et al., 2000). La función del SNAT2 en el SNC no está muy clara, ya que al mostrar una baja afinidad por glutamina no parece participar en el ciclo glutamina-glutamato. No obstante, muestra mayor afinidad por otros aminoácidos neutros y su papel puede ser especialmente importante en el axón donde SNAT1 no es expresado (Melone et al., 2004). Se le ha relacionado también con mecanismos de adaptación a cambios osmóticos (Maallem et al., 2008), siendo el único transportador del sistema A que transporta al osmolito betaína con baja afinidad ($K_m \approx 5 \text{ mM}$) (Nishimura et al., 2014).

1.4.5.3. SNAT3

Este transportador, que se encuentra en varios órganos como el hígado o el riñón, se expresa en el SNC siendo el hipocampo una de las regiones donde está en mayor proporción. El SNAT3 se encuentra exclusivamente en astrocitos (Boulland et al., 2002, 2003). Entre los pocos sustratos del SNAT3 se encuentran la L-glutamina y la L-histidina ($K_m = 1-1,5 \text{ mM}$) (Gu et al., 2000), aunque también muestra una afinidad muy reducida por L-alanina y asparragina. La principal función atribuida a este transportador es su participación en el ciclo glutamina-glutamato al ser uno de los encargados de liberar la glutamina sintetizada en los astrocitos (Boulland et al., 2002; Chan et al., 2016). Esta función se le atribuye dada su facilidad para actuar en modo reverso, dependiendo de la concentración del sustrato, de la del sodio o del pH (Bröer et al., 2002; Todd et al., 2017).

1.4.5.4. SNAT5

SNAT5 es el otro transportador perteneciente al sistema N que se encuentra en el SNC y en otros en órganos como el pulmón, el hígado o el estómago. Dentro del SNC el hipocampo es una de las regiones donde se encuentra en mayor proporción, quedando limitada su aparición a astrocitos (Cubelos et al., 2005). Una importante característica de su expresión es que está asociada habitualmente a terminales glutamatérgicas (Cubelos et al., 2005; Rodríguez et al., 2014). Tiene más sustratos que el SNAT3 porque además de L-glutamina ($K_m \approx 1 \text{ mM}$) e L-histidina ($K_m = 0,2-0,6 \text{ mM}$) muestra afinidad por aminoácidos neutros pequeños como L-alanina o L-serina ($K_m \approx 0,75 \text{ mM}$) y con una menor afinidad también por glicina ($K_m \approx 7 \text{ mM}$) (Nakanishi et al., 2001b; Baird et al., 2004; Hamdani et al., 2012). Dada su capacidad para actuar como transporte reverso, ya que para glutamina muestra la misma afinidad extra- que intracelularmente (Baird et al. 2004), se le relaciona también con el ciclo glutamina-glutamato colaborando con el SNAT3 en la liberación de glutamina desde la glía.

También destaca su posible implicación en los movimientos de otros aminoácidos implicados en la neurotransmisión como la glicina y la serina (Hamdani et al., 2012).

1.5. HIPOXIA/ISQUEMIA

Los aminoácidos neurotransmisores son esenciales para el funcionamiento del SNC y sus transportadores son piezas fundamentales en el establecimiento de sus niveles extra- e intracelulares, por lo que la alteración de su función está involucrada en numerosas patologías del SNC, como la esclerosis lateral amiotrófica, la epilepsia o el Parkinson (Kristensen et al., 2011; Nakagawa y Kaneko, 2013). Otro claro ejemplo es la isquemia cerebral donde el mal funcionamiento de los transportadores de glutamato se considera parte esencial en el desarrollo de la lesión (REF).

La isquemia cerebral es el proceso fisiopatológico por el cual un tejido recibe un aporte insuficiente de oxígeno y nutrientes por una interrupción en el flujo sanguíneo. Esto desencadena una disfunción del tejido afectado que se manifiesta con la aparición súbita de déficits neurológicos y que si persiste por debajo de un umbral de flujo conlleva la necrosis del tejido. Las causas más comunes de este fenómeno son en población envejecida la oclusión aterotrombótica o cardioembólica de una arteria cerebral mientras que en la población más joven es el vasoespasma secundario a una hemorragia subaracnoidea. Otra posible causa también frecuente es la rotura intracraneal de una arteria con la consecuente hemorragia intraparenquimatosa (Prieto-Arribas et al., 2008).

Una de las características que se presenta en un fenómeno de isquemia es la producción de una hipoxia. El insuficiente aporte de oxígeno tiene una especial relevancia en el sistema nervioso donde se produce un alto consumo de oxígeno debido al alto requerimiento energético que muestra este sistema. Los efectos de la disminución del oxígeno sobre la neurotransmisión son prácticamente inmediatos, quedando ésta deprimida en cuestión de pocos minutos. Este efecto depresor está mediado principalmente por el aumento de adenosina que se produce de manera muy temprana en estos fenómenos (Pedata et al., 1993; Dale et al., 2000). El aumento de

adenosina puede provenir tanto de neuronas como de astrocitos, y se realiza a través de diversos mecanismos que incluyen su liberación por despolarización neuronal, la inhibición de sus sistemas de recaptura o funcionamiento en modo reverso, a través de canales sensibles a volumen y una especial relevancia parece tener el aumento de adenosina por la degradación enzimática del ATP y otros nucleótidos (Pedata et al., 1993; Pascual et al., 2005; Yamashiro et al., 2017). El efecto de adenosina sobre la neurotransmisión es ejercido principalmente a través del receptor A1 que se encuentra tanto a nivel presináptico como postsináptico. A nivel presináptico disminuye la liberación de glutamato (Tanaka et al., 2001; McCool y Farroni, 2001; Choi et al., 2015), mientras que a nivel postsináptico produce hiperpolarización vía canales de potasio inhibiendo la activación de los receptores NMDA (Thompson et al., 1992; de Mendonça et al., 1995; Sebastião et al., 2001). En conjunto estos mecanismos producen efectos neuroprotectores frente a la excitotoxicidad producida por glutamato en hipoxia/isquemia (Sebastião et al., 2001; Mukandala et al., 2016).

Los efectos lesivos producidos por la hipoxia en neuronas en presencia de glucosa tardan más tiempo en manifestarse, habiéndose observado recuperaciones de la señal sináptica en rodajas de hipocampo expuestas a periodos de hipoxia con glucosa de hasta 90 minutos (Sebastião et al., 2001). Sin embargo pasado el tiempo suficiente o en presencia de otros estímulos nocivos, numerosos efectos lesivos se hacen patentes estando la mayoría relacionados entre sí, como la excitotoxicidad por glutamato, el hinchamiento celular, la entrada masiva de calcio, la disfunción mitocondrial o el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). De todos estos mecanismos el efecto neurotóxico ejercido por una presencia elevada de glutamato parece ser uno de los factores fundamentales en toda la cadena de eventos que desemboca en la muerte neuronal. En la lesión de hipoxia/isquemia se han detectado elevados niveles de glutamato en el espacio extracelular con capacidad para producir efecto excitotóxico (Benveniste et al. 1984; Bullock et al. 1998; Hutchinson et al. 2002). La elevación de los niveles de glutamato puede tener varias fuentes, algunas que implican la ruptura o degradación de membranas como la liberación del contenido intracelular tras la muerte en el núcleo del infarto y su difusión a las zonas adyacentes (Winfrey et al., 1996; Yao et al., 2007) o la extravasación del contenido plasmático

debida a una hemorragia intracraneal (Westergren et al., 1994; Koizumi et al., 1997; Østergaard et al., 2013). Durante el fenómeno de hipoxia/isquemia los transportadores de glutamato se pueden encontrar inhibidos o incluso funcionar en modo reverso promoviendo una mayor concentración de glutamato en el espacio extracelular (Sánchez-Prieto y González, 1988; Nicholls y Attwell, 1990; Madl y Burgesser, 1993; Rossi et al., 2000; Camacho y Massieu, 2006). Aunque no todos los transportadores de glutamato se encuentran inutilizados durante la hipoxia y al menos en etapas iniciales se ha comprobado su correcta funcionalidad, especialmente los transportadores de glutamato presentes en la glía (Rao et al., 2001; Mitani y Tanaka, 2003). El mantenimiento del V_m durante los primeros momentos de la hipoxia/isquemia es un argumento a favor de que los sistemas de transporte continúen funcionando. En procesos de hipoxia en neuronas del hipocampo se ha observado una hiperpolarización inicial acompañada de una disminución de la resistencia de entrada (R_{in}) y un aumento de la conductancia de potasio (Hansen, 1985; Fujiwara et al., 1987; Grigg y Anderson, 1989; Hyllienmark y Brismar, 1999). Este periodo de hiperpolarización es seguido por una despolarización lenta causada principalmente por el fallo de las bombas Na^+/K^+ ATPasas debido al colapso energético ocasionado por la hipoxia (Fujiwara et al. 1987; Tanaka et al. 1997). Si a la hipoxia se le añade la falta de glucosa, este proceso se acelera y aparece un fenómeno de despolarización rápida (donde participan elevadas concentraciones extracelulares de potasio y glutamato) que anula el V_m (Tanaka et al., 1997; 1999; Somjen, 2001). Una vez que esta despolarización rápida tiene lugar, es muy poco probable que la célula se recupere tras el periodo de hipoxia. La temperatura y la presencia de glucosa son factores determinantes en la aparición de la despolarización rápida, incrementando la latencia de la aparición de este proceso con bajas temperaturas y altos niveles de glucosa (Xu y Pulsinelli, 1994; Grigg y Anderson, 1989; Hyllienmark y Brismar, 1999).

Aún hay otros mecanismos adicionales que pueden intervenir en la liberación de glutamato como es la exocitosis del neurotransmisor estimulada por su propio efecto despolarizante (Choi y Rothman, 1990) o la liberación desde la glía a través de canales aniónicos activados por volumen (Kimelberg et al., 1990; Haskew-Layton et al., 2008).

La mayoría de estos procesos que inducen la liberación y acumulación en el espacio extracelular de glutamato se producen también en otros aminoácidos, los cuales han sido detectados a concentraciones muy elevadas durante procesos de hipoxia/isquemia (Butcher et al., 1990; Hirai y Okada, 1993; Kanthan et al., 1995; Hutchinson et al., 2002). Estas concentraciones elevadas de aminoácidos pueden agravar los efectos lesivos de glutamato al ser varios de ellos neurotransmisores o neuromoduladores excitadores facilitando la activación del receptor NMDA, como es el caso de aspartato, glicina o serina (Hirai y Okada, 1993; Wallis et al., 1995; Newell et al., 1997; Fuchs et al., 2012). De hecho se ha correlacionado el aumento de la liberación de aminoácidos con la extensión del daño isquémico (Butcher et al., 1990). Aunque algunos de estos aminoácidos liberados se piensa que pueden tener efecto neuroprotector, como taurina, que por una parte su liberación serviría para compensar el incremento de volumen celular y por otra muestra un efecto antioxidante que podría ser beneficioso (Schaffer et al., 2014).

Glutamato puede ejercer sus efectos tóxicos de varias maneras, una de ellas es por la despolarización y entrada de sodio, lo que conlleva un aumento de volumen por el aumento de la osmolaridad intracelular que ocasiona la acumulación de este ion, incremento que se ve reforzado por el fallo de las bombas Na^+/K^+ ATPasas. En estos procesos de hinchamiento el cloruro es otro elemento fundamental el cual se introduce de forma secundaria a la entrada de sodio (Rothman, 1985; Choi, 1987). El hinchamiento de las diversas células nerviosas produce varios efectos entre los que está el ya mencionando aumento de la liberación de aminoácidos por mecanismos dependientes de volumen. También se ha comprobado que un incremento de volumen causa un aumento en la excitabilidad que puede ser debido entre otros factores a una menor difusión de los neurotransmisores de la hendidura sináptica por el incremento de tamaño de las terminales sinápticas y la glía que la rodea (Chebabo et al., 1995a,b; Huang et al., 1997; Nicholson et al., 2000). Este incremento de volumen también facilita la generación y extensión del fenómeno de la despolarización propagada que tiene especial relevancia en los procesos de hipoxia/isquemia donde su producción se asocia con la expansión y/o agravamiento de la lesión (Chebabo et al., 1995a; Müller, 2000; Joshi y Andrew, 2001; Lauritzen et al., 2011). En relación al incremento de

volumen una de las terapias usadas para el tratamiento de estas patologías cuando presentan edema cerebral es el empleo de agentes osmóticos como el manitol con el fin de reducir la cantidad de agua en el cerebro al pasar del espacio intersticial al intravascular y a su vez del intracelular al extracelular. También sería capaz de disminuir la viscosidad de la sangre mejorando el flujo sanguíneo e incluso podría tener efectos antioxidantes, sin embargo hasta el momento su eficacia no ha podido ser probada en ningún ensayo clínico y además presenta importantes efectos secundarios como el fenómeno de rebote del edema cerebral (ver reviews Berecki et al., 2007; Grände y Romner, 2012).

Además de la entrada de sodio y cloruro, la activación de los receptores de glutamato promueve la entrada de calcio a través de ellos mismos y también a través de canales de calcio dependientes de voltaje al provocar la despolarización celular (Uematsu et al., 1989; Brooks y Kauppinen 1993; Pisani et al., 1998). Esta entrada de calcio es uno de los elementos principales en la lesión tardía por glutamato, ya que junto a la disfunción energética causa una alteración en la homeostasis del calcio que desemboca en cadenas de señalización para la activación de necrosis o apoptosis (Choi, 1987; Choi y Rothman, 1990; Bano y Nicotera, 2007; Prentice et al., 2015). La localización del receptor NMDA a través del cual entra el calcio en la hipoxia/isquemia parece tener relevancia en el efecto neurotóxico del calcio, siendo la activación de los receptores NMDA extrasinápticos la más perjudicial, aunque algunos autores también han mostrado un efecto neurotóxico por la activación de los receptores NMDA sinápticos (Wroge et al., 2012; Zhou et al., 2013).

Estos procesos excitotóxicos conducen a diferentes tipos de muerte celular. En el núcleo de la lesión isquémica el tipo más frecuente es la necrosis que se produce principalmente por un incremento excesivo del calcio citosólico que activa calpainas (Hou y MacManus, 2002). Se caracteriza por una dilatación de las organelas y del espacio perinuclear así como por una vacuolización del citoplasma, mientras que el núcleo al principio se ve poco afectado hasta que finalmente se hincha y es lisado. En última instancia la célula es fagocitada (Clarke, 1999). Normalmente se manifiesta de manera rápida pero la necrosis también puede ser parte del daño tardío por isquemia cuando es inducida por la activación de receptores de muerte (Degterev et al. 2008). El

otro tipo principal de muerte celular producido en isquemia es la apoptosis que es predominante en la zona de penumbra. Esta se caracteriza por varios cambios a nivel nuclear que consisten en una compactación de la cromatina y una condensación nuclear que termina en la fragmentación del núcleo. Estas modificaciones nucleares se acompañan con una reducción y fragmentación del citoplasma que desemboca en los cuerpos apoptóticos. También se acompaña de una pérdida de ribosoma del retículo endoplásmico rugoso y de los polisomas, aunque el resto de organelas mantienen una morfología normal inicialmente (Clarke, 1990). Este tipo de muerte celular tarda horas en manifestarse (Meloni et al., 2011; Puyal et al., 2013), aunque en algunos estudios se ha observado la aparición de núcleos picnóticos en tan solo una hora tras la lesión isquémica (Mitani y Tanaka, 2003).

Uno de los cambios histológicos producidos durante la lesión de hipoxia/isquemia que se puede detectar de forma más temprana es la desaparición de la tubulina, componente esencial en la formación de los microtúbulos que son los responsables, entre otras funciones, de formar el citoesqueleto y realizar el transporte intracelular. Esta desaparición puede observarse durante el mismo proceso de isquemia y su grado de desaparición depende de la duración del proceso isquémico, llegándose a observar de forma parcial un periodo 7 minutos de isquemia y total cuando este periodo se prolonga hasta 30 minutos (Yamamoto et al., 1987). La desaparición del marcaje de tubulina se ha comprobado que está asociada a la desintegración de los microtúbulos (Tomimoto y Yanagihara, 1992). Otro cambiomorfológico que se puede observar de forma temprana es la disgregación de polirribosomas ocurre tras 20 minutos de isquemia siendo más notable en el periodo de reperfusión (Tomimoto y Yanagihara, 1992). La pérdida del marcaje a la proteína neuronal nuclear (NeuN) es otro cambio morfológico que se puede detectar de manera temprana, tras 6 horas después de un periodo de 30 minutos de isquemia (Unal-Cevik et al. 2004). Este marcador que se usa en periodos más largos desde la lesión isquémica (días) para contabilizar la pérdida neuronal puede ser usado de manera más temprana (horas) como indicador de daño neuronal que posteriormente desarrolle en muerte neuronal (Unal-Cevik et al., 2004; Collombet et al., 2006).

2. OBJETIVOS

Tras los experimentos realizados para la consecución del primer objetivo se planteó el siguiente y así de forma consecutiva hasta llegar al último.

1. Determinar qué transportadores son los responsables de la potenciación duradera de la eficacia sináptica y de la excitabilidad del axón provocada por la taurina.
2. Esclarecer si la potenciación sináptica provocada por diferentes aminoácidos está producida por incrementos en el volumen celular.
3. Determinar si las mezclas de aminoácidos a concentraciones fisiológicas son capaces de potenciar la transmisión sináptica y excitabilidad axonal.
4. Estudiar si las mezclas de aminoácidos a concentraciones plasmáticas modifican los efectos de un periodo de hipoxia sobre la transmisión sináptica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El modelo experimental de la rodaja de hipocampo se desarrolló a principios de los años setenta (Skrede y Westgaard, 1971) y presenta una serie de ventajas que le hacen ser actualmente un modelo de referencia en el estudio de procesos de plasticidad sináptica y de patologías neurológicas como el Alzheimer. Entre las ventajas destacan, una buena conservación de las conexiones sinápticas, poseer una morfología altamente estructurada lo que facilita la colocación de los electrodos con precisión, y el control que se puede ejercer sobre los componentes químicos del medio así como de la temperatura, pH, etc.

Las rodajas presentan su máxima estabilidad entre las 3-7 horas después de su preparación (Sajikumar et al., 2005).

3.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS RODAJAS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de entre 170 a 240 gramos de peso y de entre 38 a 49 días de edad. Se criaron en el animalario del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal, y su cuidado y mantenimiento se ajustaron a las directrices de la Comunidad Europea (86/609/ECC).

Los animales se sacrificaron por decapitación con una guillotina tras haber sido anestesiados por inhalación de isoflurano. La cabeza se trasladó rápidamente a la mesa de trabajo donde se realizó un corte sagital para separar la piel y la calota craneal. Con una gubia quirúrgica se separaron los huesos parietales y frontales y se procedió a la extracción del encéfalo. Tras retirar los pedúnculos cerebrales y las meninges, si fuera necesario, se depositó en un vaso de precipitados que contenía la solución Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) a 1°C aproximadamente y burbujeada con gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂).

Pasados unos 30 segundos se volvió a manipular el encéfalo, primero retirando el cerebelo y después separando los dos hemisferios, dejando uno de ellos en el vaso de precipitados con la solución KRB mientras que en el otro se procedió a la extracción del hipocampo con dos espátulas. Una vez limpiado el mismo, se depositó en una placa Petri con KRB enfriado y burbujeado, para a continuación repetir en el otro hemisferio el mismo proceso de extracción del hipocampo. Durante toda la manipulación,

sehumedeció el tejido cerebral aplicándole con una pipeta de vidrio la solución KRB enfriada y burbujeada.

Los hipocampos aislados fueron colocados en un cortador manual (Stoelting) con un pincel y se realizaron cortes transversales para obtener rodajas de 400 μ M de espesor. Las rodajas, que solo fueron obtenidas de la porción central del hipocampo dorsal, se colocaron con el pincel en una pequeña placa Petri llena de solución KRB a 1°C aproximadamente y burbujeada con gas carbógeno.

Finalmente las rodajas fueron colocadas con una pipeta de vidrio en la cámara de mantenimiento donde permanecieron al menos tres horas antes de ser utilizadas para los procedimientos experimentales. El tiempo que transcurrió en todo el proceso, desde el sacrificio de la rata hasta que las rodajas se depositaron en la cámara de mantenimiento, fue inferior a cinco minutos. Es importante que todo este proceso se realice en el menor tiempo posible para evitar que episodios isquémicos interfieran con el correcto funcionamiento celular, y a bajas temperaturas para minimizar el metabolismo celular y así prevenir cambios celulares irreversibles (Sajikumar et al., 2005).

La cámara de mantenimiento, similar a la descrita por Nicoll y Alger (1981), está formada por un cubo de metacrilato de 1 litro de capacidad con tapa y con un cilindro en su parte central del mismo material. Sobre el cilindro se sitúa una placa de Petri de 3 centímetros de diámetro se encuentra llena de solución KRB a temperatura ambiente y sobre ella se coloca un papel Whatman (grado 1), el cual se empapa de la solución. Es sobre este papel donde se depositan las rodajas para que de esta forma difundan los nutrientes a través del papel empapado en la solución KRB. La cámara cuenta con una atmósfera oxigenada y saturada en vapor de agua gracias a que el fondo de la cámara se encuentra lleno con agua destilada burbujeada constantemente con gas carbógeno, lo que permite una buena oxigenación de la rodaja.

Pasado el período mínimo de 3 horas de estabilización para que sus niveles metabólicos volvieran a los valores normales, se trasladó una rodaja a la cámara de registro con una pipeta de vidrio. En la cámara de mantenimiento las rodajas llegaron a permanecer hasta 10 horas.

3.2. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

3.2.1. Cámara de Registro

La cámara de registro, que sigue el modelo descrito por Nicoll y Alger (1981), fue una placa de metacrilato con dos pocillos situados uno enfrente de otro y conectados entre sí. En el pocillo delantero fue donde se ubicó la rodaja que permaneció completamente sumergida en la solución. Allí, a través de un canal en la placa, llegaba el tubo de perfusión por donde se aplicaron las diferentes soluciones a un flujo constante de 2 ml/min gracias a una bomba peristáltica (*Masterflex L/S Digital Economy Driver*). Las soluciones se mantuvieron a una temperatura de $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por la acción de unas células de calor de efecto Peltier controladas con un termorregulador (*Cibertec*). La sonda de este termorregulador estuvo en contacto con la solución en el pocillo posterior. En este mismo pocillo también se ubicó el mecanismo de succión que consistía en una aguja metálica acoplada al sistema de vacío del edificio y cuya altura en el pocillo se determinó mediante un micromanipulador. De esta forma se pudo establecer de forma precisa y sencilla el volumen de líquido en el que la rodaja fue sumergida.

Para mantener la rodaja fija durante todo el experimento, se colocó entre dos redes de nylon que se habían formado al adherir la red tensada a sendas arandelas de plástico. Estas estructuras se encajaron justas en el pocillo y en la superior se realizaron unos pequeños canales para que el líquido circulara de forma continua por el interior de la red, asegurando el correcto suministro de nutrientes y oxígeno a la rodaja. El diámetro de red de la malla fue el suficiente para la colocación de los electrodos de estimulación y registro.

Todo este equipo estaba situado sobre una mesa antivibratoria (*BenchTop, Newport Corporation*) para evitar interferencias externas. Sobre esta mesa se colocaron también las bases magnéticas que sirvieron como soporte a los electrodos y los micromanipuladores Märzhäuser MM-33 (Wetzlar-Steindorf) necesarios para su manejo. Este sistema nos otorgó una amplia libertad de movimientos a la hora de colocar los electrodos para la realización del experimento.

Por último, para la visualización del tejido se utilizó una lupa (*Leica MZ6*) cuyo peso no fue soportado por la mesa antivibratoria. La iluminación del tejido se hizo mediante luz fría con una fibra óptica colocada debajo del pocillo delantero, la intensidad de luz podía ser regulada (*Fiber-Lite MI-152, Dolan-Jenner*) aunque por lo general se mantuvo constante.

3.2.2. Registros de los potenciales extracelulares provocados

Los registros electrofisiológicos en esta tesis se han centrado únicamente en la región CA1 del hipocampo y concretamente en el “stratum radiatum” de esta región (ver Fig.3.1). En esta zona se encuentran las fibras colaterales de Schaffer que son los axones de las células piramidales de CA3, los cuales establecen numerosos contactos sinápticos “en passant” con las dendritas apicales proximales de las neuronas piramidales de CA1. Las sinapsis que se producen son del tipo excitador siendo el glutamato su neurotransmisor. Estas fibras también son capaces de activar a las interneuronas inhibitoras presentes en la zona a través de sinapsis glutamatérgicas, las cuales forman sinapsis GABAérgicas sobre las dendritas apicales de las neuronas piramidales.

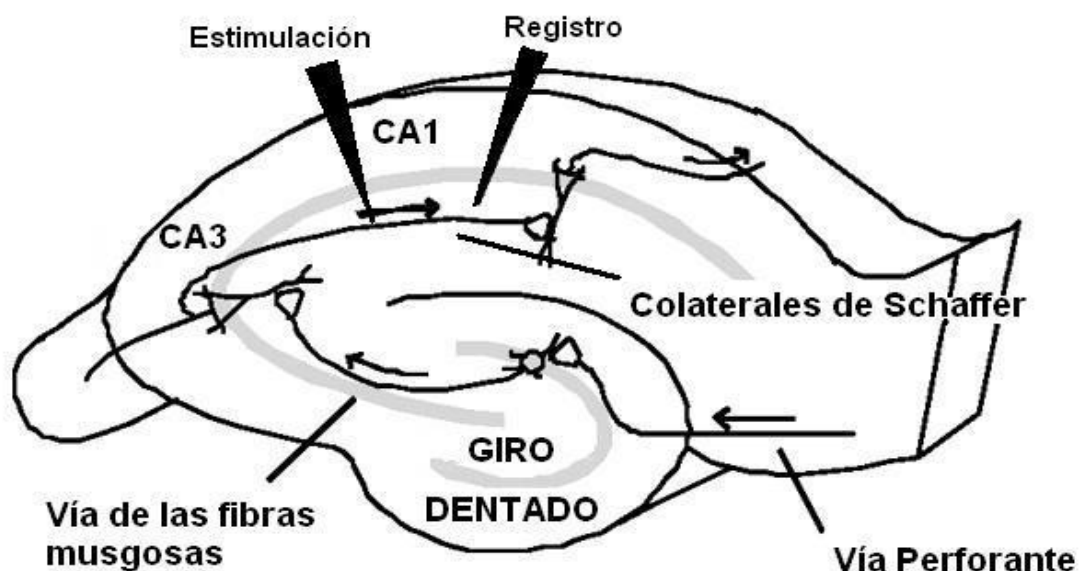


Fig. 3.1 Esquema de una rodaja de hipocampo en la que se representa la disposición de los electrodos de estimulación y registro.

La distribución compactada y perfectamente delimitada de las neuronas piramidales permite la formación de claros potenciales extracelulares de campo al estar los sumideros y las fuentes de corriente claramente definidos. Para provocar estos potenciales extracelulares se aplicó un pulso de corriente rectangular bifásico de 100 μ s de duración por fase, el cual fue originado a través del programa informático Clampex 10.2 (*Molecular Devices, LLC*) y cuya intensidad, así como la polaridad de las dos fases, fue regulada por una unidad aisladora de estímulo (*ISU 200 BIP, Cibertec*). Para la aplicación de este pulso eléctrico se utilizaron electrodos de tungsteno de 0,1 ó 0,5 $M\Omega$ (*WPI*) que fueron posicionados en el “stratum radiatum” de la CA1. Como electrodo de retorno se utilizó otro electrodo de tungsteno de la misma resistencia que fue colocado en el tejido junto al electrodo de estimulación con una separación de unos 100 μ m (estimulación bipolar) o alejado en la cámara de registro (estimulación monopolar).

El estímulo eléctrico generó potenciales de acción en las fibras colaterales de Schaffer que se propagaron en ambas direcciones y promovieron la liberación de glutamato en las cientos de sinapsis que establecen con las dendritas apicales. Este proceso sináptico lo observamos como cambios en el potencial de campo, produciéndose una onda negativa con relación a tierra al registrarse en la región dendrítica. Esta señal se denomina potencial excitador postsináptico de campo (fEPSP, de sus siglas en inglés) y corresponde a las corrientes sinápticas excitadoras. La activación de las fibras axónicas también se hace visible como una pequeña onda negativa que precede al fEPSP, llamada potencial de fibra (FV, de sus siglas en inglés) que nos indica el número y la sincronización de los potenciales de acción provocados en estas fibras. Un parámetro a tener en cuenta como indicador del buen estado funcional de la rodaja es la relación entre el tamaño del FV y el fEPSP, siendo este último entre 4 a 7 veces mayor cuando hay una buena transmisión sináptica. Estas dos señales fueron registradas con un electrodo de tungsteno con una punta de 1-2 micras de diámetro y 1 $M\Omega$ de impedancia (*WPI*), que colocamos en el “stratum radiatum” de la CA1 enfrentado al electrodo de estimulación. El electrodo de registro se conectó a un preamplificador de corriente alterna y alta impedancia, fabricado en nuestro laboratorio utilizando un T.E.C. (transistor de efecto de campo). La señal registrada fue filtrada (3 kHz) y amplificada con un amplificador *Grass* mod 7P511H, y posteriormente digitalizada por una tarjeta de adquisición Digidata 1440A (*Molecular Devices, LLC*).

La misma disposición de electrodos fue utilizada para la medida de los cambios producidos en la resistividad del tejido pero aplicando un estímulo monofásico en vez de bifásico y a una intensidad que no provocara la aparición de respuesta sináptica. Por tanto los cambios de voltaje observados en el potencial serían debidos principalmente a cambios en la resistencia del tejido.

3.2.3. Registros de los potenciales intracelulares

Los registros intracelulares se consiguieron con micropipetas de vidrio utilizando capilares estirados con un estirador P-87 (*Sutter Instrument Company*) y rellenos con una solución de metilsulfato potásico 2 M (resistencias de 80-120 M Ω). La micropipeta se colocó de forma longitudinal a la capa de neuronas piramidales y se introdujo en la misma descendiendo poco a poco gracias a un motor eléctrico acoplado al eje vertical del micromanipulador, hasta que se consiguió penetrar una neurona.

La estimulación sináptica se produjo de la misma manera que en los registros extracelulares, pero en esta ocasión la señal que se obtuvo fue una onda despolarizante rápida correspondiente al EPSP de la célula pinchada. Este EPSP está causado por la activación de receptores postsinápticos glutamatérgicos de las neuronas piramidales. La intensidad de estimulación en estos experimentos fue menor que la necesaria para provocar la aparición de potenciales de acción. Los electrodos intracelulares se conectaron a un preamplificador Headstage 2A X 1L (Molecular Devices, LLC.) de ganancia unidad y una resistencia de entrada de 100 K Ω . Las señales se amplificaron y filtraron con un equipo Axoclamp-2A (Molecular Devices, LLC.) en modo fijación de corriente.

Este sistema permitió que 300 ms antes de la estimulación sináptica se inyectara corriente hiperpolarizante durante 50 ms a través de la micropipeta. La deflexión de voltaje causada por este pulso hiperpolarizante nos permitió calcular la Rin. Solo fueron consideradas en este estudio las células con un Vm estable y más negativo que -60 mV, y con una Rin mayor que 30 M Ω .

3.2.4. Protocolos de estimulación

Durante los experimentos se estimuló constantemente a una frecuencia de 0,67 Hz (1/15s) y a una intensidad (5-25 μ A) que provocase un fEPSP con una amplitud de un 40% de su valor máximo.

Para comprobar si se producían variaciones en la actividad presináptica se provocó el fenómeno de “facilitación por pares de pulsos” mediante la estimulación con pares de pulsos homosinápticos separados 50, 80, 100, 150 ó 250 ms. El fenómeno consiste en que el segundo pulso produce una mayor respuesta sináptica que el primero, debido a que el calcio que entra en la terminal presináptica con la primera estimulación no se disipa totalmente cuando se produce la segunda, por lo que aumenta la probabilidad de liberación del neurotransmisor. Variaciones en el cociente de los fEPSP producidos por ambos pulsos(P2/P1) se interpreta como la existencia de cambios en la función presináptica, de tal forma que un aumento en el cociente indicaría una disminución en la probabilidad de liberación, mientras que una disminución del cociente indicaría un aumento en la liberación de neurotransmisor (Zucker, 1989). Cada intervalo lo aplicamos con una frecuencia de 0,33 Hz (1/30s).

Se realizaron también curvas estímulo-respuesta mediante la aplicación de estímulos de intensidad creciente, cubriendo el rango de intensidades desde que aparece la señal hasta que termina el crecimiento lineal de la pendiente del fEPSP. En nuestros experimentos aplicamos 3 pulsos para cada intensidad y representamos la media de los valores del fEPSP frente a los del FV para cada intensidad. Con la representación del fEPSP frente al FV se realizó el ajuste a una recta. Los incrementos en la pendiente de esta recta indican un aumento en la eficacia sináptica, mientras que la disminución de la pendiente significa una pérdida de eficacia sináptica.

3.2.5. Análisis de las señales electrofisiológicas

Los registros electrofisiológicos grabados se analizaron con el programa Clampfit 10.2 (*Molecular Devices, LLC*). Para la medida del FV se calculó su amplitud siendo esta la distancia entre el primer hombro y el pico más negativo. La señal se

descartó en los casos que no se pudo visualizar bien el FV. La magnitud del fEPSP se estimó con el valor de la pendiente medida en el primer tercio de la señal, para evitar posibles contaminaciones por la aparición de espigas poblaciones que están producidas por la generación de potenciales de acción en la región somática (Fig. 3.2). En el caso de la medida de la resistividad, el parámetro medido fue su amplitud siendo esta la distancia entre la línea basal y el pico más negativo (Fig. 3.3).

De los registros intracelulares los parámetros analizados fueron, la R_{in} que se calculó a partir de la deflexión de voltaje producida por una corriente hiperpolarizante de 0,1-0,3 nA de 50 ms de duración, el V_m que se obtuvo durante los primeros 10 ms de la adquisición de la señal antes de inyectar corriente o estimular sinápticamente, y la pendiente del EPSP que se midió de la misma forma que la utilizada para el fEPSP extracelular (Fig. 3.4). Para la representación de los distintos experimentos se trabajó normalmente con señales normalizadas, tomando los primeros 20 minutos de señal estable como el 100% y normalizando respecto a ellos.

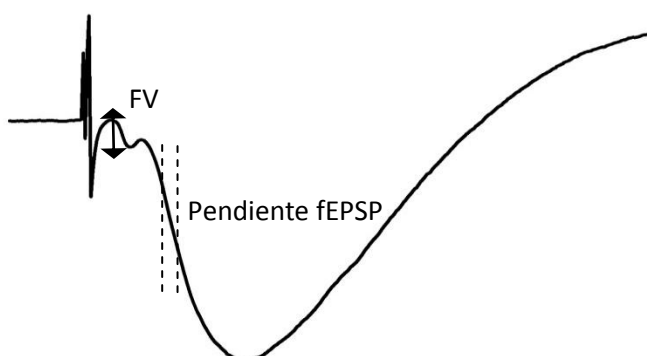


Fig. 3.2. **Medida del fEPSP y el FV.** Se muestra un ejemplo de registro donde se indica entre las líneas punteadas la región del fEPSP en la cual se mide la pendiente. La línea con flechas señala la medida de la amplitud del FV.

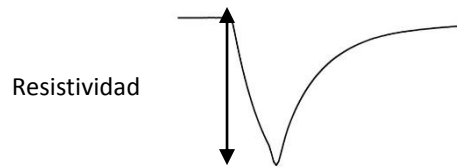


Fig. 3.3. **Medida de la Resistividad.** Se muestra un trazo ejemplo de registro de resistividad donde la amplitud medida quedaría entre las dos flechas.

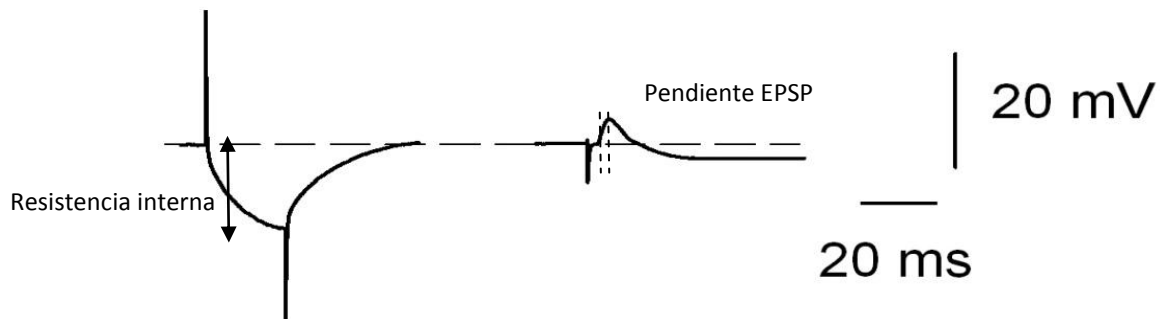


Fig. 3.4. **Medida del EPSP y la Resistencia de entrada.** Se muestra un trazo ejemplo de registro intracelular donde la línea con dos flechas muestra el potencial hiperpolarizante del cual obtenemos la resistencia de entrada y las dos líneas discontinuas verticales marcan el intervalo donde es medida la pendiente del EPSP. La línea discontinua horizontal muestra el potencial de membrana en reposo.

3.3. ANALISIS DE LOS AMINOÁCIDOS

Para la determinación de la concentración de los diferentes aminoácidos en las rodajas, al final de algunos experimentos la rodaja se depositó en un Eppendorf donde se sumergió en 200 μ l de ácido sulfosalicílico al 10%, siendo congelada a -80° C hasta su posterior análisis.

Los aminoácidos fueron analizados usando un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC del inglés "High Performance Liquid Chromatography"), tal como se

describe en Perucho et al. (2015). Explicado brevemente, el proceso consistió en la homogeneización del tejido en ácido perclórico 0,4 N para su desproteinización. Los sobrenadantes fueron derivatizados previamente a su paso por la columna con orto-ftalaldehído (OPA). El reactivo fue una mezcla de 32 mg de OPA en un tampón de borato 0,4 M pH 9,5 (7140 μ l) con 60 μ l de ácido 3-mercaptopropiónico. Los aminoácidos derivatizados fluorescentes fueron separados por una columna “*Luna 3 μ M C18 Phenomenex*” (150 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 3 μ m) usando un gradiente de elución.

Los gradientes se realizaron con dos mezclas de solventes desgasificadas. El solvente A fue acetato de sodio 0,05 M pH 5,88: metanol (90:10), y el solvente B fue metanol: H₂O (70:30). Dos programas de elución se utilizaron para la determinación del mayor número de aminoácidos con la suficiente exactitud. Un programa corto que permiti6 la distinción de los aminoácidos glicina, treonina y arginina, que no se distinguen en el programa largo, junto a aspartato, glutamato, serina, glutamina, histidina, taurina, tirosina y GABA. También se usó un programa largo para cuantificar la cantidad de metionina, valina, fenilalanina, isoleucina y leucina que no aparecen en el corto. La tasa de flujo del solvente se ajustó a un 0,5 ml/min y el volumen de inyección fue de 20 μ l.

La detección de la fluorescencia fue realizada con un detector Jasco (modelo FP-2020) en las longitudes de onda de 240 y 360 nm para excitación y emisión, respectivamente. Los aminoácidos fueron identificados por sus tiempos de retención y sus concentraciones fueron calculadas por comparación a unas soluciones estándar de aminoácidos (1,5 μ M).

Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Antonio Sánchez Herranz, el Dr. Rafael Martín del Río y María José Asensio.

3.4. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

Se utilizó un animal para el estudio de los cambios morfológicos producidos por procesos de hipoxia y administración de aminoácidos. Se compararon las rodajas control con las que sufrieron un episodio de hipoxia.

3.4.1. Procesamiento y fijación del tejido

Una vez acabado el registro electrofisiológico, la rodaja se retiró de la cámara de registro y se sumergió en paraformaldehído al 4% disuelto en tampón salino con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) a un pH 7,4 para su fijación, donde se mantuvo durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavaron con PBS y posteriormente, para su inclusión en parafina, se deshidrataron progresivamente con concentraciones crecientes de etanol y se completó este proceso con pases en butanol. Un día después, se realizaron los cortes del tejido en parafina en secciones coronales de 5 y 10 µm de cada rodaja, utilizando un micrótopo (Microm, Mod. HM 325). Estas secciones se montaron sobre portas cargados positivamente (Dako Cytomation) en los que podían quedar almacenados por bastante tiempo.

3.4.2. Tinción histológica

Primero se retiró la parafina de las secciones realizando pases, en primer lugar en una solución de xilol y después en soluciones de concentraciones decrecientes de etanol, finalizando con una solución de agua destilada. Posteriormente se aplicó la tinción violeta de cresilo al 0,1% a 60 °C durante 7-8 min. Tras la aplicación del colorante se diferenció con cambios en etanol al 96º y un paso en etanol al 100º, para después aclarar con xilol y montar las preparaciones para su visualización cubriéndolas con un cubreobjetos con el medio de montaje Entellan.

3.4.3. Inmunohistoquímica

Como en el apartado anterior en primer lugar se procedió a retirar la parafina de las secciones utilizando el método ya descrito, añadiendo un último paso consistente en un lavado con medio PBS. Entonces las secciones de tejido fueron tratadas con acetato de sodio 10 mM, pH 6,0 a 95 °C durante 4 minutos y preincubadas con suero normal de cabra al 5% (NGS, por sus siglas en inglés) en un PBS (pH 7,4)/0,1% Triton X-100 durante 30 minutos. Se utilizaron los anticuerpos primarios

anti- β -tubulina isotipo 3, policlonal, obtenido en conejo (1:200; Biolegend) y anti-NeuN, clon A60, obtenido en ratón (1:500; Millipore) que fueron aplicados durante 24 h a 4 °C. El revelado de los anticuerpos primarios se realizó con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo obtenido en cabra y conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor-488 (1:400;Life Technologies) y anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor-568 (1:400;Life Technologies). Después de su tratamiento para la inmunohistoquímica, estas secciones fueron colocadas en un cubreobjetos con un medio que contenía p-fenilendiamina y bisbenzimidaz (Hoechst 33342; Sigma Aldrich) para la detección del núcleo. Antes de la visualización las preparaciones se bloquearon con NGS al 5% y Tritón al 0,1% disuelto en PBS.

La visualización de ambas técnicas, tanto la tinción histológica como la inmunohistoquímica, se llevó a cabo con un microscopio Nikon Eclipse modelo E400 que permite observar tanto mediante luz transmitida como fluorescencia.

Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Diana Reimers Cerdá y Silvia Sacristán

3.5. SOLUCIONES DE PERFUSIÓN

La solución salina utilizada tanto para la obtención y mantenimiento de las rodajas como para el desarrollo de los experimentos fue la solución KRB cuya composición viene reflejada en la tabla 3.1(expresada en mM). Esta solución se preparó diariamente a partir de soluciones madres 10 veces más concentradas que la solución de trabajo y que fueron almacenadas en nevera a 4°C. Todos los componentes se obtuvieron de Sigma o Merck. La osmolaridad fue controlada diariamente con un microsmómetro Mod3.Moplus (*Advanced Instruments*) y se mantuvo en los $295 \pm 0,2$ mOsm. En algunos experimentos se realizaron modificaciones en la composición de la solución tal como se refleja en la tabla 3.1.

Componentes	KRB Normal	KRB Hiperosmótico	KRB Hiposmótico	KRB Alto Ca-Mg	KRB Isetionato
NaCl	119	119	94	119	0
KCl	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
NaHCO₃	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2
KH₂PO₄	1	1	1	1	1
MgSO₄	1,3	1,3	1,3	4	4
CaCl₂	2,5	2,5	2,5	4	4
Glucosa	11	11	11	11	11
Sacarosa	0	30	0	0	0
Isetionato Sódico	0	0	0	0	119

Tabla 3.1. Soluciones de perfusión

En los experimentos en los que se utilizó una concentración de magnesio y calcio elevada, se cortó con un bisturí las conexiones entre la región CA1 y CA3 en la frontera entre la CA2 y CA3.

Todas las soluciones aplicadas fueron burbujeadas constantemente con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) para mantener la oxigenación y el pH de la solución (7,4 aprox.), con la excepción de los periodos en los que se provocó hipoxia en cuyo caso se burbujó con un gas compuesto por 95% N y 5% CO₂.

En la mayoría de experimentos se aplicaron aminoácidos, bien en solitario o bien en combinación con otros aminoácidos. Se usaron dos tipos de mezclas (tabla 3.2), una que contenía los aminoácidos mayoritarios del líquido extracelular a concentraciones que remedaban este medio (Karnani et al., 2011) y que denominamos “Extra”. La otra mezcla recoge a los principales aminoácidos presentes en el plasma a las concentraciones que se pueden observar en este medio (Lerma et al., 1986; Nishimura et al., 1995) y que nombramos “Plasma”. En ambas mezclas no se incluyeron los aminoácidos excitadores, aunque en algunos experimentos con la mezcla Plasma si se añadieron glutamato y aspartato, quedando este hecho indicado en cada caso. Los aminoácidos de la mezcla Plasma que habían mostrado un efecto potenciador del fEPSP a concentraciones de 10 mM fueron usados para elaborar la

mezcla “Plasma1”, mientras que el resto compuso la mezcla “Plasma2”. Se probaron diferentes combinaciones con los aminoácidos de la mezcla Plasma1, cuya composición viene especificada en la tabla 3.3.

En los experimentos en los que se usó solo un aminoácido o la mezcla Extra, se disolvió en KRB la cantidad de aminoácido necesaria para la realización de un experimento. En el caso de las distintas mezclas de aminoácidos Plasma, se prepararon soluciones madres de estos aminoácidos disueltas en agua destilada cuya concentración viene reflejada en la tabla 3.4. Estas soluciones madres fueron conservadas en nevera y se renovaban al menos mensualmente. En la tabla 3.4 vienen recogidos los aminoácidos y otras sustancias neuroactivas empleadas.

Extra	[AA] final μM	Plasma	[AA] final μM
L-Ala	51	L-Ala	480
L-Arg	16	L-Arg	153
L-Asn	55	L-Asn	60
		L-Cys	12
L-Gln	246	L-Gln	733
Gly	26	Gly	172
L-His	47	L-His	48
L-Iso	12	L-Iso	80
L-Leu	24	L-Leu	130
L-Lys	53	L-Lys	427
L-Met	8	L-Met	50
L-Phe	18	L-Phe	69
		L-Pro	226
L-Ser	27	L-Ser	177
Tau	21	Tau	263
L-Thr	34	L-Thr	234
L-Trp	5	L-Trp	64
L-Tyr	18	L-Tyr	76
L-Val	24	L-Val	197
		L-Glu	110
		L-Asp	10

Tabla 3.2. Mezclas de aminoácidos

AA Plasma 1	AA Plasma 1.1	AA Plasma 1.2	AA Plasma 1.3	AA Plasma 1.4	AA Plasma 2
L-Ala	L-Ala	L-Gln	L-Gln	L-Ala	L-Arg
L-Gln	Gly	L-His	Gly	L-Gln	L-Asn
Gly	L-Ser	Tau	L-His	Gly	L-Cys
L-His		L-Thr	Tau	L-His	L-Iso
L-Ser			L-Thr	Tau	L-Leu
Tau				L-Thr	L-Lys
L-Thr					L-Met
					L-Phe
					L-Pro
					L-Tyr
					L-Trp
					L-Val

Tabla 3.3. Mezclas de aminoácidos plasmáticos.

<u>COMPUESTO</u>	<u>SOLUCIÓN MADRE</u> <u>(mM) en H₂O mQ</u>	<u>CASA</u> <u>COMERCIAL</u>
Ácido 2-amino-fosfo-pentanoico (AP5)	25	Sigma
Ácido Aspártico (L-Asp)	5	Sigma
Ácido Glutámico (L-Glu)	27,5	Sigma
Ácido β -guanidinopropiónico (β -GPA)		Sigma
L-Alanina (L-Ala)	240	Sigma
D-Alanina (D-Ala)		Sigma
L-Arginina (L-Arg)	76,5	Sigma
L-Asparragina (L-Asn)	30	Sigma
Betaína (Bet)		Sigma
L-Cisteina (L-Cys)	6	Sigma
L-Fenilalanina (L-Phe)	34,5	Sigma
L-Glutamina (L-Gln)		Sigma
Glicina (Gly)	86	Sigma
L-Histidina (L-His)	24	Sigma
L-Isoleucina (L-Iso)	40	Calbiochem
L-Leucina (L-Leu)	65	Sigma
L-Lisina (L-Lys)	213,5	Calbiochem
L-Metionina (L-Met)	25	Sigma
MK-801	10	Sigma
L-Prolina (L-Pro)	113	Sigma
D-Prolina (D-Pro)		Sigma
Sarcosina (Sar)		Sigma
L-Serina (L-Ser)	88,5	Sigma
D-Serina (D-Ser)		Sigma
Taurina (Tau)	131,5	Sigma
L-Tirosina (L-Tyr)	1	Sigma
L-Treonina (L-Thr)	117	Sigma-aldrich
D-Treonina (D-Thr)		Sigma
L-Triptofano (L-Trp)	32	Merck
L-Valina (L-Val)	98,5	Sigma

Tabla 3.4. Aminoácidos y otras sustancias aplicadas

3.6. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los parámetros de los potenciales provocados fueron normalizados respecto a la media de los valores obtenidos durante el período control. Además, se promediaron los resultados de los experimentos individuales de cada condición experimental para obtener la media para cada minuto de experimento. Los datos se expresaron como el valor medio de n experimentos \pm error estándar de la media (EEM). Los trazados originales mostrados son promedios de 8 trazados consecutivos. El mismo tipo de experimento nunca fue realizado en más de 2 rodajas por animal.

Para la obtención de las gráficas en las que se representa los experimentos realizados se utilizó el programa SigmaPlot 11.0. Este mismo programa se empleó para realizar los análisis estadísticos y para comparar diferentes condiciones experimentales. La comparación entre un par de medias se realizó con el test estadístico de la t de Student (t -test) cuando los valores seguían la normalidad, en el caso contrario se utilizó el test de Mann-Whitney. Las comparaciones realizadas frente al periodo basal se hicieron respecto a la media de los 20 minutos de este periodo. En el caso de que las muestras fueran dependientes la prueba utilizada fue la de la t pareada (t -test pareado). Cuando había más de dos variables se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor si solo se comparaba entre distintas condiciones experimentales y el ANOVA de dos factores si además de las concentraciones se tenía en cuenta el tiempo. Las diferencias se analizaron con el test de Bonferroni si se encontraron fuentes de variación no debidas al azar.

Para establecer la existencia o no de correlación entre una serie de valores se calculó el coeficiente de correlación de Pearson y se ajustó a la ecuación de una recta.

4. RESULTADOS

4.1. AMINOÁCIDOS Y TRANSMISIÓN SINÁPTICA

Como se ha comentado previamente, la taurina es capaz de aumentar la eficacia sináptica y la excitabilidad axonal, efecto que al parecer requiere un sistema de transporte de aminoácidos (ver Introducción, apartado 1.2). En este capítulo se detallan los experimentos realizados en la búsqueda del transportador implicado en estos efectos potenciadores de taurina mediante la utilización de múltiples sustratos de varios sistemas de transporte de aminoácidos.

4.1.1. Efecto sobre la transmisión sináptica de algunos compuestos que son sustratos o no del PAT1

Por las razones expuestas en la Introducción (apartado 1.4), nuestra hipótesis inicial fue que el PAT1 es uno de los mejores candidatos para ser el transportador que media las acciones de la taurina en la potenciación sináptica. Para su estudio se evaluó el efecto de uno de sus sustratos, el β -GPA (Metzner et al., 2009). Este análogo de creatina con propiedades antihiperglicémicas muestra una constante de afinidad de 1,3 mM para este transportador. Los experimentos realizados consistieron en la aplicación del sustrato durante 30 minutos, tras al menos 20 minutos del registro de una respuesta sináptica estable, y seguidos por una hora de periodo de lavado del compuesto (Fig. 4.1). Este protocolo fue utilizado en todos los experimentos en los que se aplicó un único aminoácido. Se estudiaron tres concentraciones de β -GPA (1, 10 y 20 mM) y se observó que durante la aplicación de la concentración de 1 mM apenas hubo variaciones en el fEPSP, mientras que las concentraciones mayores produjeron la depresión total de la señal. Este efecto podría deberse a la activación de los receptores GABA_A por β -GPA (Morris et al., 1983; Barolet et al., 1985). Al retirar el compuesto, independientemente de la concentración empleada, el fEPSP se potenció por encima de su valor basal y permaneció potenciado al menos una hora. Para comprobar si la aplicación de β -GPA modificaba significativamente el fEPSP al final de lavado y si había diferencias entre las distintas concentraciones de β -GPA, se realizó un ANOVA de dos factores. Se comprobó que todas las concentraciones provocaban un incremento significativo del fEPSP ($F_{(1,62)}=145,02$; $p < 0,001$) y que existían diferencias entre las distintas concentraciones, siendo el incremento del fEPSP mayor en la concentración

de 10 mM ($183 \pm 9,8\%$; $n = 10$) que en la de 1 mM ($142,9 \pm 6,8\%$; $n = 19$) ($p < 0,001$; test de Bonferroni), pero no se observó diferencia entre la de 10 y la de 20 mM ($189,1 \pm 17,8\%$; $n = 5$). Los valores presentados aquí (y a lo largo del capítulo de resultados) corresponden a la media de los últimos 10 minutos de lavado, excepto que se señale otra cosa.

Por otra parte, la aplicación de β -GPA provocó un incremento del FV que comenzó pasados poco más de 10 minutos de su administración para las tres concentraciones utilizadas. Como sucedió con en el fEPSP este incremento se mantuvo tras la hora de la retirada del sustrato ($F_{(1,54)} = 79,38$; $p < 0,001$; ANOVA) con una ligera reducción al final del periodo de lavado respecto al máximo que alcanza al principio de la misma fase. En este caso existen diferencias al final de la fase de lavado ($F_{(2,50)} = 8,52$, $p < 0,001$; ANOVA) entre las concentraciones de 1 mM ($123,2 \pm 5,9\%$; $n = 16$) y 10 mM de β -GPA ($160,8 \pm 7,1\%$; $n = 8$) ($p < 0,001$; test de Bonferroni), pero no con la concentración de 20 mM de β -GPA ($140,1 \pm 9,3\%$; $n = 4$).

La acumulación intracelular del compuesto administrado fue otro parámetro relevante en nuestro estudio, sin embargo, al no disponer de un método para analizar la molécula de β -GPA, solo evaluamos en este caso el contenido de diferentes aminoácidos en la rodaja (Fig. 4.1 C). De esta manera buscábamos hallar interacciones tanto en los procesos de captación como de intercambio y síntesis, procesos que en definitiva podrían cambiar el contenido de los aminoácidos de la rodaja. La rodaja fue recogida tras el periodo de lavado para su estudio con HPLC (ver Materiales y métodos apartado 3.3) y se analizó el contenido de 16 aminoácidos. Entre las diferencias encontradas frente a las rodajas control, que en vez de aminoácidos o análogos fueron perfundidas únicamente con la solución de KRB, destaca la reducción en la cantidad de GABA ($F_{(3,38)} = 32,75$; $p < 0,001$; ANOVA). Otra diferencia compartida por las tres concentraciones es el incremento en el contenido de glutamina ($F_{(3,40)} = 7,9$ $p < 0,001$; ANOVA).

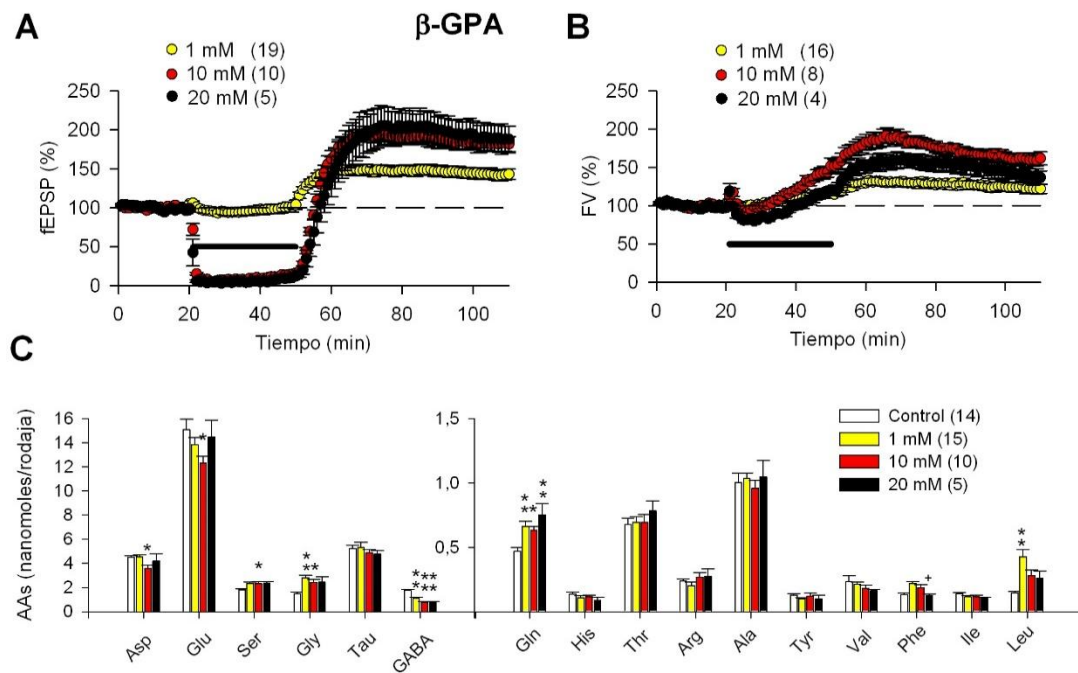


Fig. 4.1. Incremento del fEPSP y el FV producido por varias concentraciones de β -GPA. Cursos temporales de la pendiente del fEPSP (A) y de la amplitud del FV (B) expresadas como el porcentaje del valor medio obtenido durante el periodo basal. Cada punto representa el valor medio \pm EEM por minuto. En esta figura y en las posteriores, el número de experimentos está entre paréntesis y las barras horizontales indican el tiempo durante el cual fue perfundida la sustancia, en este caso β -GPA. La línea discontinua marca el 100% de la señal. (C) Los diagramas de barras expresan el contenido de varios aminoácidos obtenidos en algunas de las rodajas utilizadas en los experimentos de electrofisiología mostrados en A. Para determinar la existencia de diferencias se utilizó un ANOVA de dos factores (tiempo y concentraciones) para los cursos temporales y de una vía para las concentraciones de aminoácidos. Si aparecían diferencias se realizaba un test de Bonferroni para esclarecer la identidad de las mismas ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **).

Con estos resultados encontramos que el β -GPA, uno de los mejores sustratos del transportador PAT1, es capaz de provocar una potenciación duradera del fEPSP y del FV como ocurre con la taurina. Para continuar con el estudio del transportador PAT1 evaluamos el efecto de un sustrato que muestra una menor afinidad que el β -GPA, como es la taurina (Anderson et al., 2009; Thondorf et al., 2011); y de dos aminoácidos que no son sustratos del transportador PAT1 como son la L-serina y la L-treonina (Chen et al., 2003; Boll et al., 2003; Metzner et al., 2006).

Para determinar el efecto de estos aminoácidos sobre la transmisión sináptica se siguió el mismo procedimiento que con β -GPA, escogiéndose esta vez las concentraciones de 3 y 10 mM (Fig. 4.2). En el caso de L-serina, dado que a estas concentraciones puede activar los receptores NMDA y causar la muerte neuronal, se

perfundió durante todo el experimento MK-801 (10 μ M). Este compuesto es un antagonista de los receptores NMDA que solo es capaz de bloquear los receptores activados (Wong et al., 1986), por lo que al principio del experimento se administró junto a una aplicación de NMDA 20 μ M durante 10 minutos.

El efecto sobre el fEPSP durante la administración de L-serina varió según la concentración aplicada, para 3 mM la señal se fue incrementando de forma constante, mientras que para 10 mM el incremento cayó abruptamente al final de la aplicación. Sin embargo, ambas concentraciones provocaron un incremento significativo del fEPSP que alcanzó un máximo al inicio del periodo de lavado y posteriormente disminuyó progresivamente hasta el final de la hora de lavado en la que aún quedó una determinada potenciación ($F_{(1,18)} = 86,15$, $p < 0,001$; ANOVA). Al final del lavado el incremento producido por 10 mM ($194 \pm 13,1\%$) fue significativamente mayor que el de 3 mM ($151,2 \pm 11,3\%$) ($p = 0,007$; test de Bonferroni). El comportamiento sobre el FV fue muy similar para ambas concentraciones mostrando un incremento del FV desde que se administró el aminoácido y que se mantuvo durante todo el periodo de lavado ($F_{(1,14)} = 41,52$, $p < 0,001$; ANOVA).

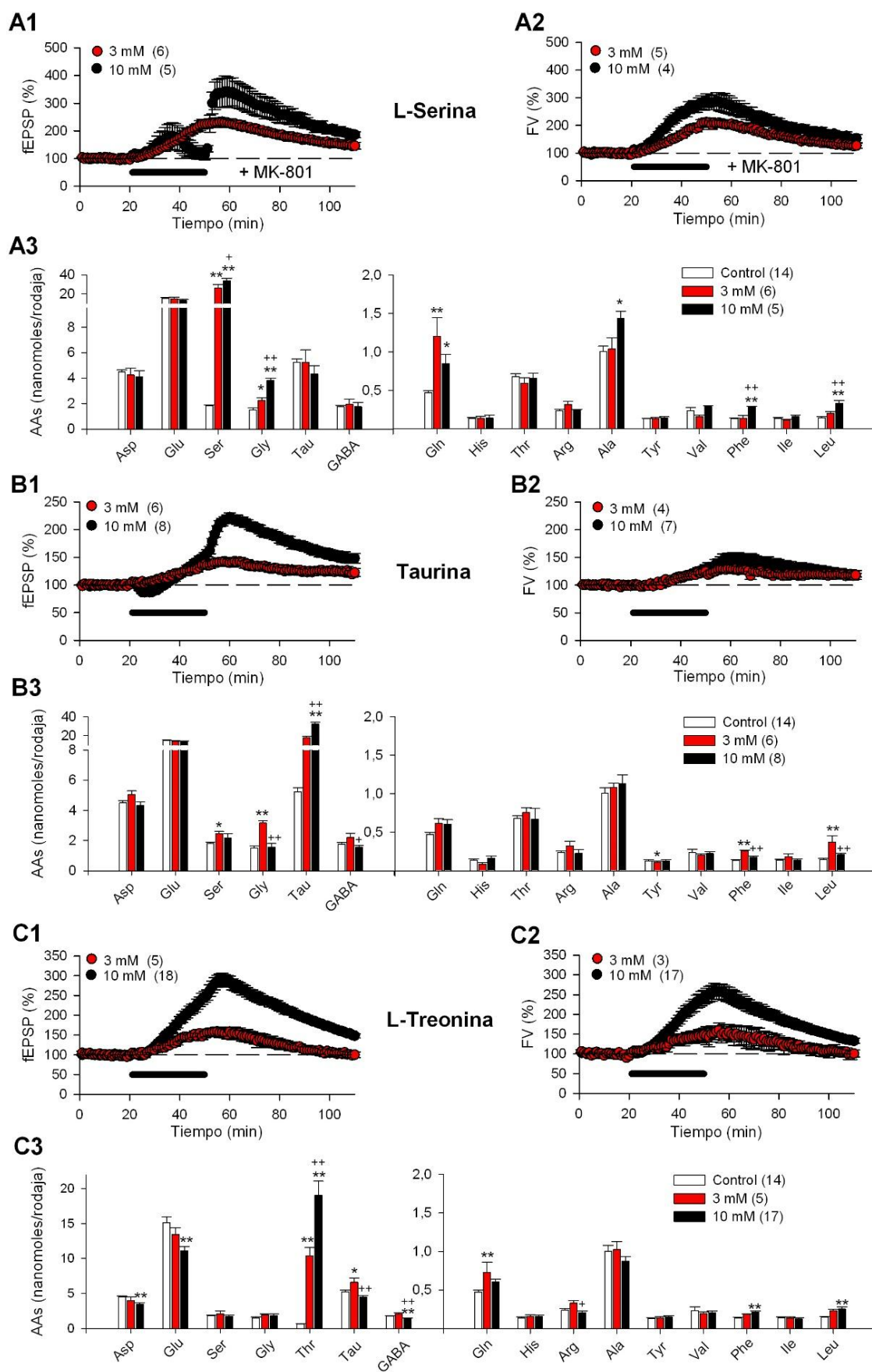
Las rodajas que fueron perfundidas con 3 y 10 mM de L-serina mostraron un gran acumulo de este aminoácido respecto a las rodajas control ($F_{(2,22)} = 119,1$; $p < 0,001$; ANOVA) (Fig. 4.2 A3). La cantidad acumulada con la concentración de 10 mM ($33,7 \pm 2,9$ nmol/rodaja) fue algo mayor que con la de 3 mM ($26,1 \pm 3,6$ nmol/rodaja) ($p = 0,034$; test de Bonferroni). También se apreció un incremento significativo provocado por ambas concentraciones en los niveles de glicina y glutamina, mientras que la concentración de L-serina de 10 mM también causó un incremento en el contenido de alanina, fenilalanina y leucina.

Taurina también provocó un aumento del fEPSP dependiente de la concentración aplicada (Fig. 4.2B) como se había demostrado en anteriores publicaciones (Galarreta et al., 1996). Esta diferencia en la potenciación del fEPSP se mantuvo hasta el final de la hora de lavado ($150,3 \pm 7,8\%$ y $124,1 \pm 7\%$ para 10 mM y 3 mM de taurina, respectivamente; $p = 0,007$; test de Bonferroni). El efecto sobre el FV consistió en un incremento desde el inicio de la aplicación de taurina que alcanzó su máximo al inicio de la fase de lavado y disminuyó durante la misma hasta llegar a niveles de $119,8 \pm 8\%$ para 10 mM y $118,5 \pm 5,4\%$ para 3 mM al final del experimento. En esta ocasión no se apreciaron diferencias significativas entre ambas concentraciones.

La taurina se acumuló de forma notable en algunas de las rodajas analizadas al final de los anteriores experimentos, pero el incremento producido por la perfusión de 10 mM de taurina ($31,9 \pm 1,3$ nmol/rodaja) fue casi el doble que el incremento producido por 3 mM ($17,9 \pm 1,3$ nmol/rodaja) ($p < 0,001$; test de Bonferroni). Curiosamente, en los experimentos en los que se aplicó la concentración de 3 mM de taurina se apreció un mayor contenido de glicina, fenilalanina y leucina respecto a la situación control y a los experimentos con 10 mM de taurina.

Los experimentos en los que se aplicó L-treonina a 10 mM muestran efectos sobre el fEPSP y el FV similares a los obtenidos con β -GPA, L-serina o taurina (Fig. 4.2C1-2). Tras una hora de lavado de L-treonina se observó una potenciación de $158,3 \pm 5,3\%$ para el fEPSP y de $139,7 \pm 7,1\%$ para el FV. No obstante, a la concentración de 3 mM de L-treonina, el efecto de potenciación no se mantuvo ni sobre el fEPSP ni sobre el FV tras una hora de haber retirado el aminoácido. Estas diferencias también fueron muy marcadas en la acumulación de L-treonina (Fig. 4.2C3), siendo casi el doble la acumulada cuando se perfundió a una concentración de 10 mM ($19,4 \pm 1$ nmol/rodaja) respecto a la de 3 mM ($10,4 \pm 1,2$ nmol/rodaja) ($p < 0,001$; test de Bonferroni). Con la concentración de 10 mM de L-treonina también se observó una disminución en el contenido de aspartato, glutamato y GABA, mientras que aumentó la cantidad de fenilalanina y leucina. Por otra parte, la concentración de 3 mM aumentó el contenido de taurina y glutamina.

Estos resultados muestran que dos aminoácidos que no actúan como sustratos del PAT1 como son la L-serina y la L-treonina son capaces de remedar el efecto potenciador sobre la transmisión sináptica que provocan tanto la taurina como el β -GPA.



4.1.2. Efecto de los aminoácidos sobre la respuesta postsináptica y la excitabilidad axonal

Teniendo en cuenta que la L-serina y la L-treonina, que no son sustratos del PAT1, produjeron el efecto de potenciación sobre el fEPSP y el FV, decidimos estudiar el efecto de otros aminoácidos sobre la transmisión sináptica con el fin de facilitar la identificación del o los transportadores involucrados en estos procesos de potenciación. Determinamos los cambios producidos en el fEPSP y el FV aplicando individualmente 19 aminoácidos diferentes siguiendo el procedimiento explicado en el apartado anterior. Todos los aminoácidos se aplicaron a la concentración de 10 mM pues a esa concentración observamos un efecto bien definido con los aminoácidos previamente estudiados. Por la misma razón que en el caso de L-serina, donde fue necesario impedir la activación del receptor NMDA, cuando se utilizaron los aminoácidos D-serina, D-alanina, L-alanina, glicina y L-prolina, perfundimos MK-801 10 μ M durante todo el experimento.

Doce de los 19 aminoácidos estudiados produjeron una potenciación del fEPSP superior a un 20% sobre los valores basales tras una hora de la retirada del aminoácido (Fig. 4.3). El efecto de estos aminoácidos sobre el fEPSP fue variable durante su aplicación, algunos produjeron una reducción de la señal que fue total y sin recuperación como en el caso del β -GPA, o una reducción parcial con recuperación sin llegar a valores basales como L-glutamina, o llegando a sobrepasar los niveles basales como sarcosina, taurina y D-treonina. Otros produjeron desde el inicio un incremento del fEPSP pero volvieron a niveles basales durante el final del periodo de aplicación, como L-alanina, D-alanina y L-serina. Y por último están los que produjeron un incremento constante de la

Fig. 4.2. **Acumulación intracelular y efecto sobre la transmisión sináptica de diferentes aminoácidos sustratos o no del PAT1.** (A1) y (A2) “+ MK-801” indica que este antagonista NMDA fue aplicado durante todo el experimento a una concentración de 10 μ M. Antes del periodo basal se administró MK-801 junto a NMDA 20 μ M durante 10 min para que pudiera bloquear al receptor. La figura muestra el curso temporal del fEPSP y del FV en las rodajas en las que se aplica 10 mM de L-serina (A1 y A2), 10 mM de taurina (B1 y B2), o 10 mM de L-treonina (C1 y C2). También muestra el perfil de aminoácidos obtenido en algunas de estas rodajas al final del experimento cuando se aplica L-serina (A3), taurina (B3) o L-treonina (C3). Las diferencias estadísticamente significativas respecto al control están indicadas con

asteriscos ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **), mientras que las diferencias entre concentraciones están señaladas con cruces ($p < 0,05$ +; $p < 0,01$ ++). Test de Bonferroni.

señalque continuó durante toda la aplicación como glicina, L-histidina, D-serina y L-treonina. El comportamiento al retirar el compuesto fue similar para todos los aminoácidos potenciadores. Al principio de la fase de lavado, entre 4 a 10 minutos de la retirada del aminoácido, se alcanzó el máximo de potenciación y a partir de ahí fue disminuyendo en mayor o menor medida según el aminoácido aplicado, quedando en un rango entre un 128% y un 195% tras la hora de lavado. El efecto sobre el FV fue más homogéneo en todos los aminoácidos potenciadores, ya que en todos incrementó durante la aplicación del aminoácido mientras que durante el período de lavado tuvo un comportamiento muy similar al fEPSP, quedando potenciado entre un 115% y un 210% a la hora de lavado.

No todos los aminoácidos probados incrementaron la transmisión sináptica y la excitabilidad axonal. Hasta 7 aminoácidos o derivados (L-arginina, betaina, L-prolina, D-prolina, L-leucina, L-metionina y L-valina) fueron incapaces de potenciar más de un 10% el fEPSP tras una hora de la retirada del compuesto y los denominamos aminoácidos no potenciadores (Fig. 4.4). La mayor parte de estos aminoácidos produjeron una reducción del fEPSP durante la administración que comprendió desde un 4% de L-valina, pasando por un 12% D-prolina, un 17% L-leucina y un 26% L-metionina, hasta el 68% de L-arginina o la reducción total de L-prolina (los valores mostrados representan la media de los últimos 5 minutos de aplicación). La excepción de este grupo es betaína que potenció ligeramente tanto el fEPSP ($109,2 \pm 2,2\%$) como el FV ($110,1 \pm 3,7\%$) al final del periodo de lavado. Para el resto, durante el periodo de lavado, el fEPSP se recuperó hasta niveles basales manteniéndose en ellos o quedando ligeramente disminuido a la hora desde la retirada del aminoácido. Respecto al FV, la mayoría de estos aminoácidos no lo alteró, excepto L-prolina que produjo un incremento durante su aplicación retornando a valores basales en el lavado, y la L-arginina que produjo una disminución en este parámetro solo durante su aplicación.

En relación con nuestro objetivo inicial, estos resultados muestran cómo algunos de los mejores sustratos del PAT1, betaína, L-prolina y D-prolina (Metzner et al., 2004), son incapaces de reproducir el efecto potenciador sobre el fEPSP y el FV. Este hecho, junto a la observación de que otros aminoácidos no sustratos del PAT1 sí provocan una potenciación duradera del fEPSP, son difícilmente compatibles con la

hipótesis de que el transportador PAT1 sea crucial para la inducción del fenómeno de potenciación sináptica producido por algunos aminoácidos.

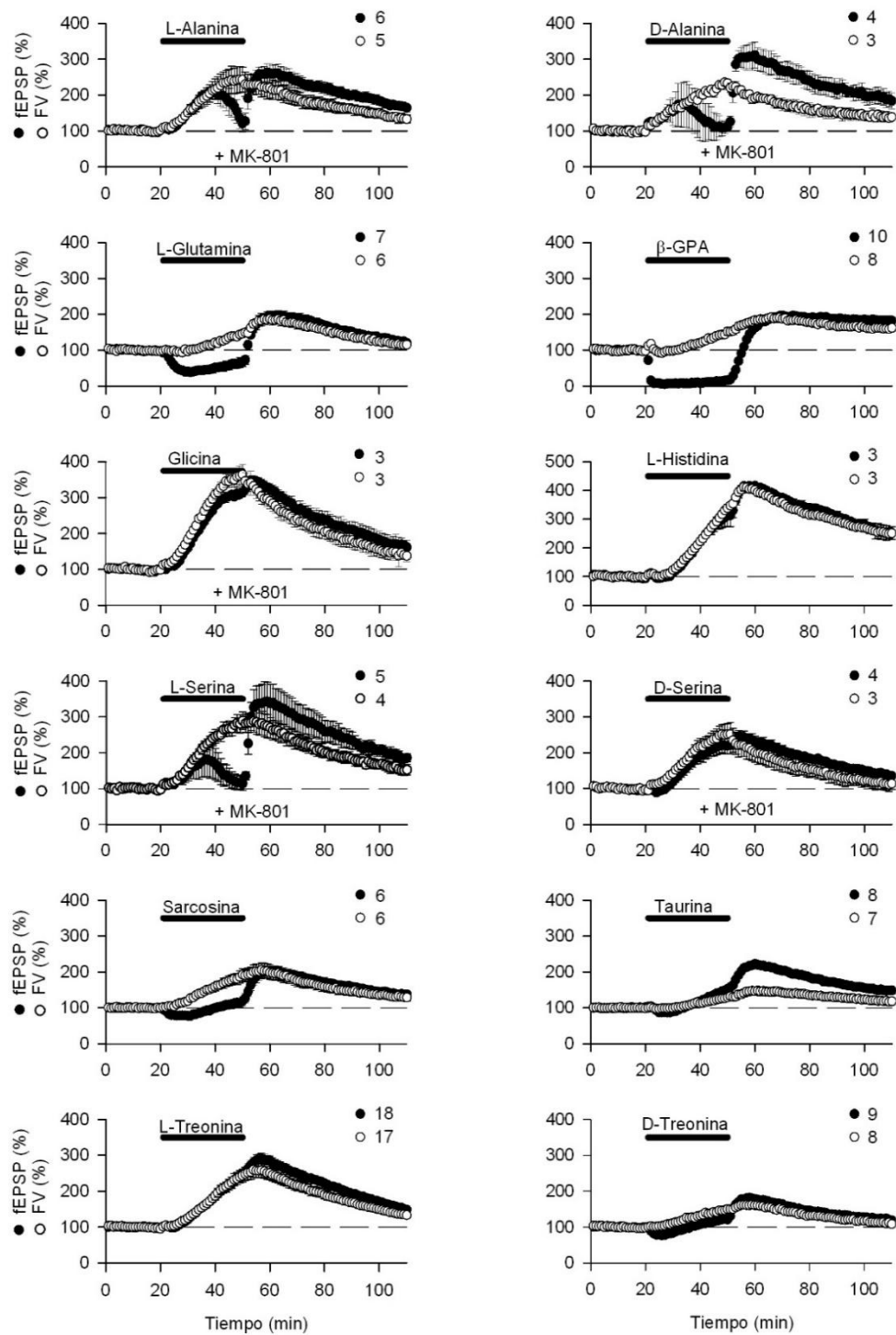


Fig. 4.3. **Aminoácidos que potencian la transmisión sináptica y el FV.** Curso temporal de los cambios sobre el fEPSP (círculos negros) y el FV (círculos blancos) producido por los

aminoácidos (a la concentración de 10 mM) que causan al menos un 20% de potenciación sobre el fEPSP al final del periodo de lavado (media de los últimos 10 minutos de lavado).

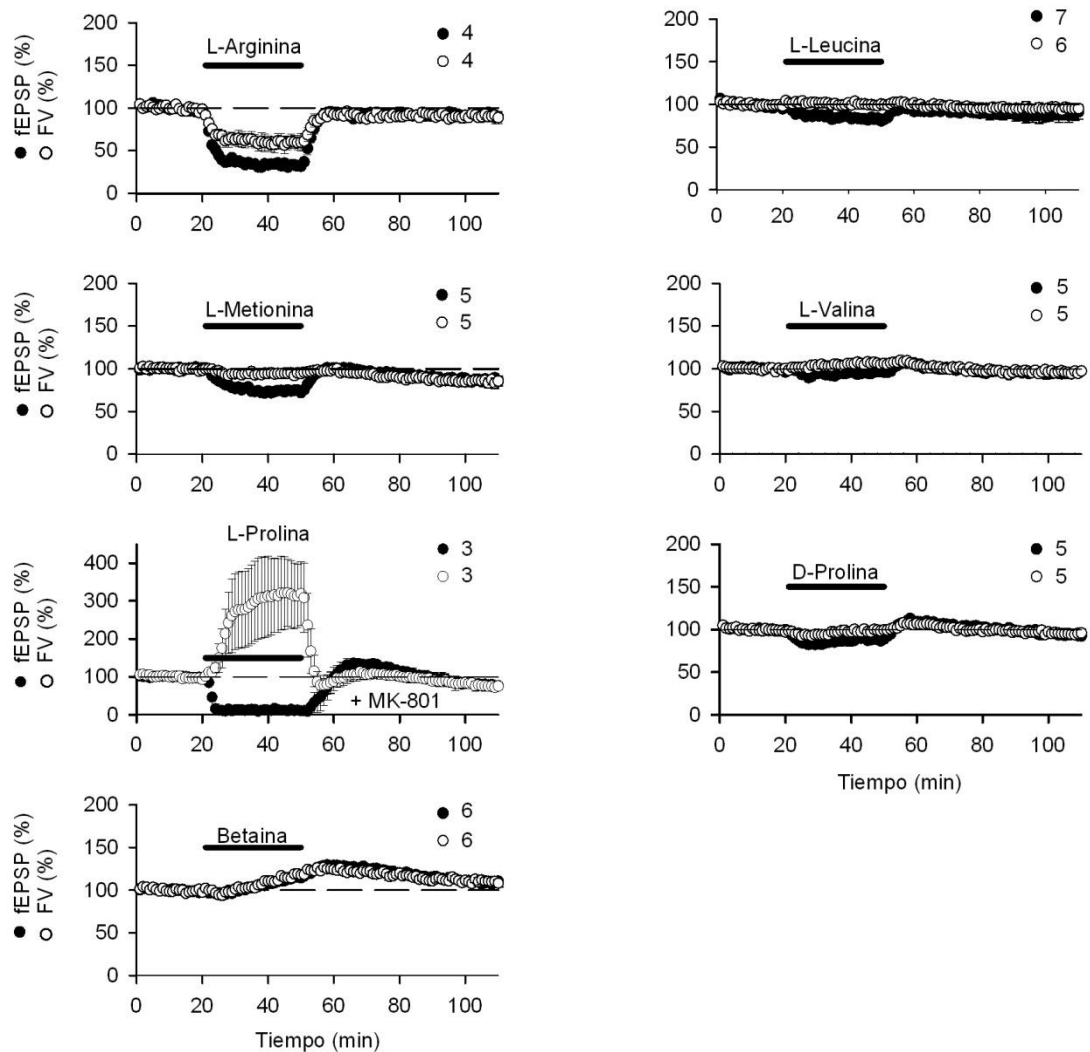


Fig. 4.4. **Aminoácidos que no provocan potenciaciones duraderas del fEPSP ni del FV.** Curso temporal de los cambios en el fEPSP y el FV producido por la aplicación los aminoácidos (a la concentración de 10 mM) no potenciadores (aquellos que no llegan al 10% de potenciación del fEPSP tras una hora de lavado).

Uno de los hechos destacables de estos resultados es la amplia variedad de aminoácidos que son capaces de provocar una potenciación duradera del fEPSP y del FV. Tal es la diversidad estructural de estos aminoácidos que no se conoce ningún

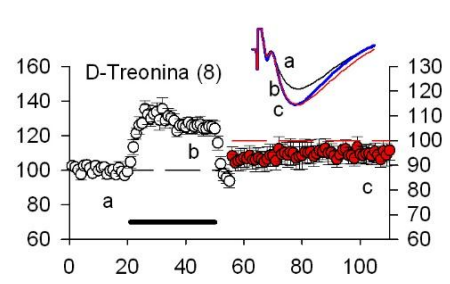
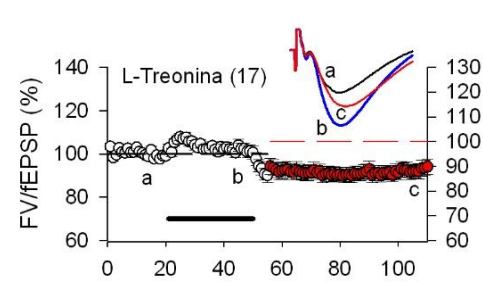
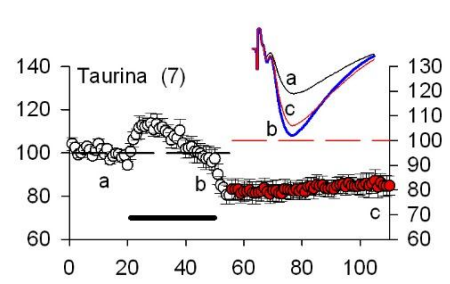
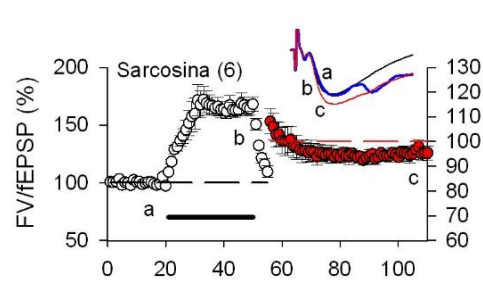
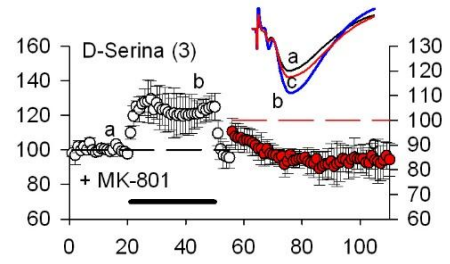
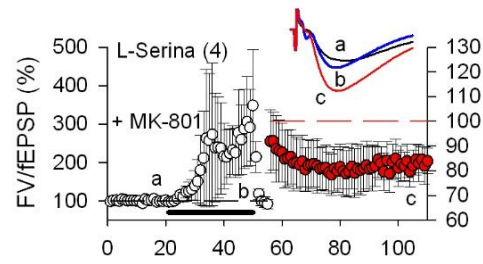
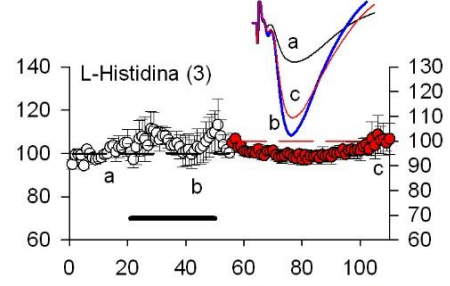
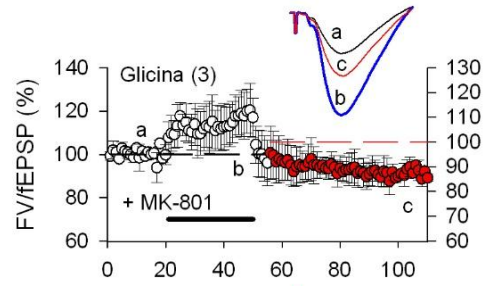
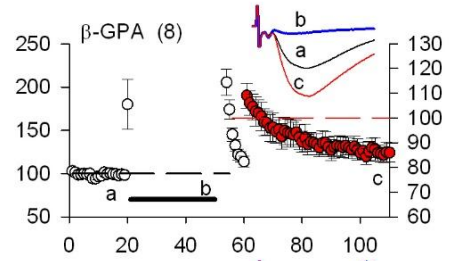
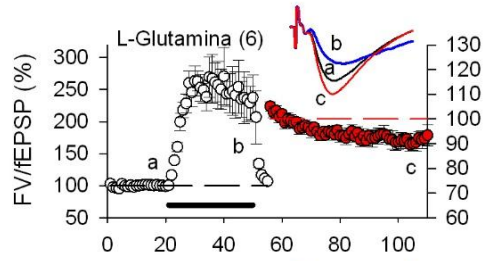
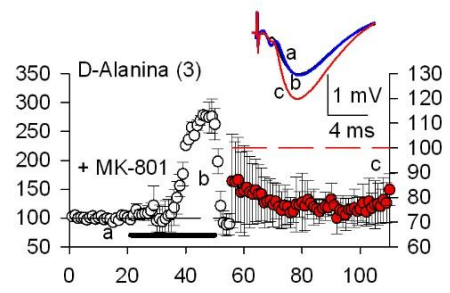
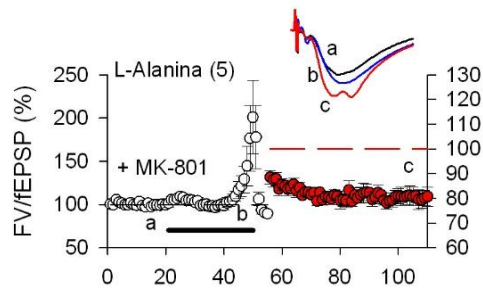
transportador que tenga por sustrato a los 12 aminoácidos que aquí clasificamos como potenciadores.

4.1.3. Efecto de la aplicación de los aminoácidos sobre la eficacia sináptica

Un aspecto a tener en cuenta a la hora de analizar los efectos de los aminoácidos sobre la transmisión sináptica es comprobar si el incremento que se produce en el fEPSP se debe únicamente al incremento del FV, ya que un aumento en el número de fibras activadas da lugar a una mayor respuesta postsináptica. Por tanto comprobamos si un mismo número de fibras es capaz de generar una mayor respuesta sináptica, lo que se conoce como eficacia sináptica.

Para determinar en nuestros experimentos la relación entre el número de fibras activadas y la respuesta sináptica obtenida se estudió el cociente del FV/fEPSP durante los cursos temporales mostrados previamente (Fig. 4.3 y 4.4). Disminuciones en este cociente indican que el incremento del fEPSP es mayor que el del FV, por tanto existe un aumento de la eficacia sináptica. En la Fig. 4.5 se muestran los cursos temporales del cociente FV/fEPSP normalizado registrado en los experimentos en los que se aplicaron aminoácidos potenciadores. Se utilizan dos escalas diferentes dentro del mismo curso temporal para mostrar con más detalle el efecto sobre la eficacia sináptica en el periodo de lavado cuando la presencia del aminoácido correspondiente no influye sobre la respuesta. En presencia del aminoácido, es cuestionable la asunción de que un cambio en el cociente FV/fEPSP sea un reflejo de la modificación de la eficacia sináptica dado que algunos de los aminoácidos pueden tener acciones extrasinápticas que alteren el registro del fEPSP. En la mayoría de casos, la eficacia sináptica disminuyó durante la perfusión de los aminoácidos, sobre todo en aquellos que disminuyeron el fEPSP, ya fuera desde el inicio de la aplicación como en el caso de L-glutamina y sarcosina o a hacia el final de este periodo como ocurrió con D-alanina y L-serina. Taurina incrementó muy poco el cociente FV/fEPSP durante la aplicación pese a reducir inicialmente el fEPSP. Durante la aplicación de L-treonina o L-histidina este parámetro apenas sufrió modificación. Al retirar el aminoácido del medio se apreció un aumento en la eficacia sináptica por parte de casi todos aminoácidos potenciadores

que se mantuvo tras una hora de lavado. Las únicas excepciones son sarcosina y D-treonina cuya reducción del cociente no llega a ser significativa, y L-histidina que incrementó la eficacia sináptica al inicio del periodo de lavado, pero no se mantuvo hasta el final.



En el caso de los aminoácidos no potenciadores, prácticamente ninguno alteró la eficacia sináptica durante el periodo de lavado (Fig. 4.6). La única excepción fue L-prolina, la cual fue incapaz de mantener hasta el final del experimento el aumento de eficacia sináptica que presentó al inicio del periodo de lavado. Sin embargo, durante la aplicación de los diferentes aminoácidos se produjo una disminución de la eficacia sináptica por la depresión que causaron sobre el fEPSP, con la excepción de la betaína.

En la Fig. 4.7 se resume y compara el efecto sobre el cociente FV/fEPSP provocado por los distintos aminoácidos al final de los diez últimos minutos de la etapa de lavado. Se puede observar que el conocido aumento de la eficacia sináptica provocado por la taurina (Galarreta et al., 1996) también puede ser inducido por otros aminoácidos: L-Ala, D-Ala, L-Gln, β -GPA, Gly, L-Ser, D-Ser y L-Thr. Este aumento de eficacia sináptica va desde un 8% a un 22% respecto a la basal (el porcentaje representa la reducción del cociente FV/fEPSP).

Fig. 4.5. Cambios de la eficacia sináptica provocada por los aminoácidos potenciadores.

Cada gráfico muestra el curso temporal de los cocientes FV/fEPSP (como indicador de la eficacia sináptica) obtenidos de los datos presentados en la Fig. 4.3. Los primeros 55 minutos se representan con círculos blancos mientras que los 55 últimos con círculos rojos a una diferente escala para observar mejor el efecto durante el periodo de lavado. Durante la perfusión de β -GPA desaparece el cociente porque no se pudo medir debido a que el fEPSP se redujo completamente. En cada gráfico se muestran tres trazados representativos para diferentes momentos del curso temporal señalados por letras, cada trazado corresponde a la media de 8 potenciales consecutivos al igual que los trazados que se mostrarán a partir de esta figura. Todos los trazados están representados a la misma escala, la cual se muestra junto al trazado de la parte superior derecha.

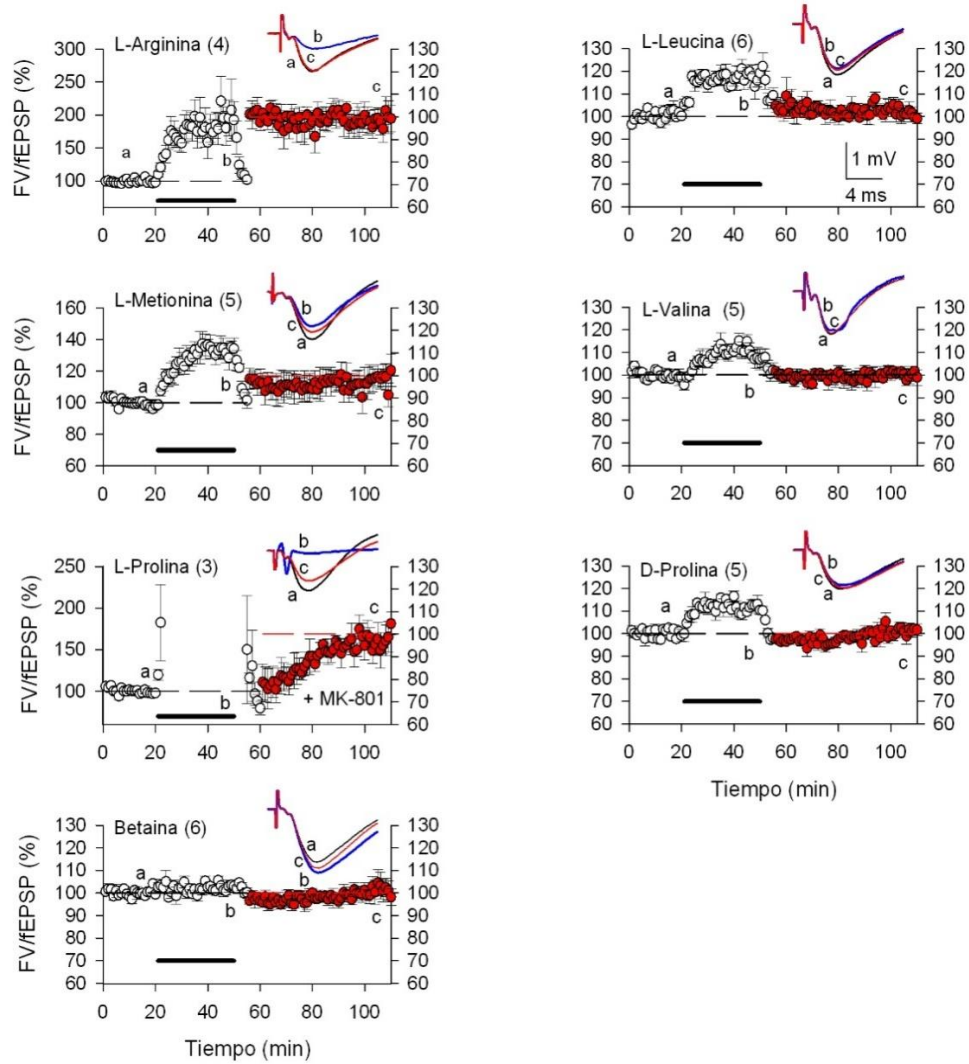


Fig. 4.6. **Cambios de la eficacia sináptica provocada por los aminoácidos no potenciadores.** Cada gráfico muestra el curso temporal de los cocientes FV/fEPSP (como indicador de la eficacia sináptica) obtenidos de los datos presentados en la Fig. 4.4. Los primeros 55 minutos se representan con círculos blancos mientras que los 55 últimos con círculos rojos a una diferente escala para observar mejor el efecto durante el periodo de lavado.

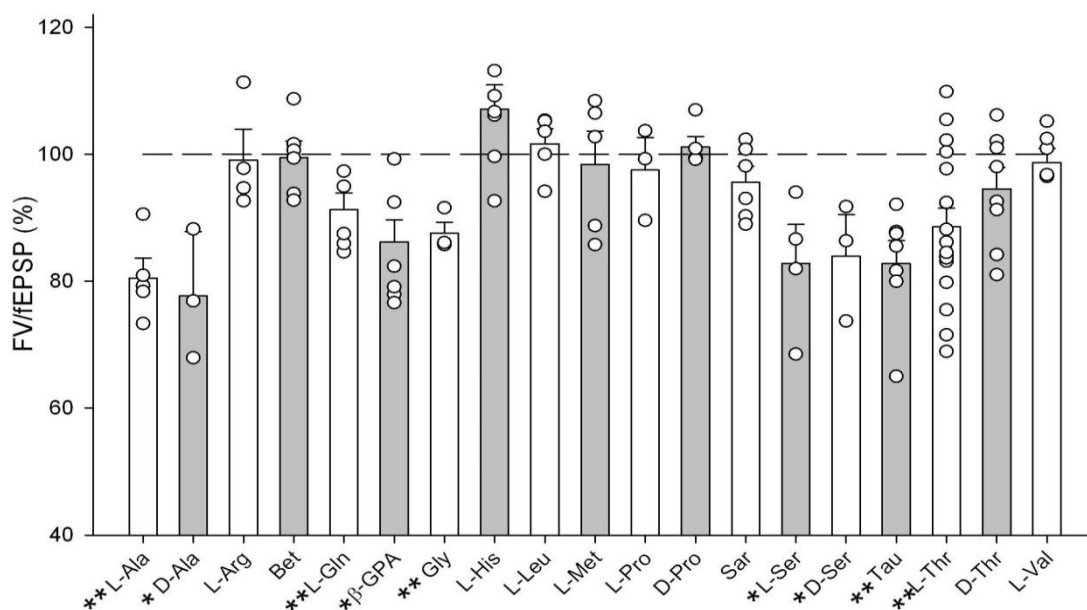


Fig. 4.7. **Resumen de los cambios en la eficacia sináptica producidos tras la aplicación de diferentes aminoácidos.** Cada barra representa la media de los últimos diez minutos de lavado de los cursos temporales anteriormente mostrados tomando los valores de los cocientes obtenidos durante el periodo basal como 100% (Fig. 4.5 y 4.6). Los círculos blancos muestran los valores de los experimentos individuales que han formado la media. Se señala con asteriscos junto al nombre de los aminoácidos aquellos que producen una reducción significativa del cociente FV/fEPSP, es decir un aumento de la eficacia sináptica respecto al periodo basal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.4. Efecto de la aplicación de aminoácidos sobre la liberación de glutamato

Con el fin de esclarecer si los cambios en la eficacia sináptica producida por varios aminoácidos podían deberse a modificaciones presinápticas en la liberación de glutamato, recurrimos al protocolo de facilitación sináptica por pares de pulsos homosinápticos (Fig. 4.8). En este protocolo se evalúa el cociente del segundo pulso frente al primero en intervalos de 50 a 250 ms. Incrementos en el cociente indicarían una reducción en la liberación de neurotransmisor, mientras que una disminución del cociente indicaría lo contrario (ver Materiales y métodos, apartado 3.2.4).

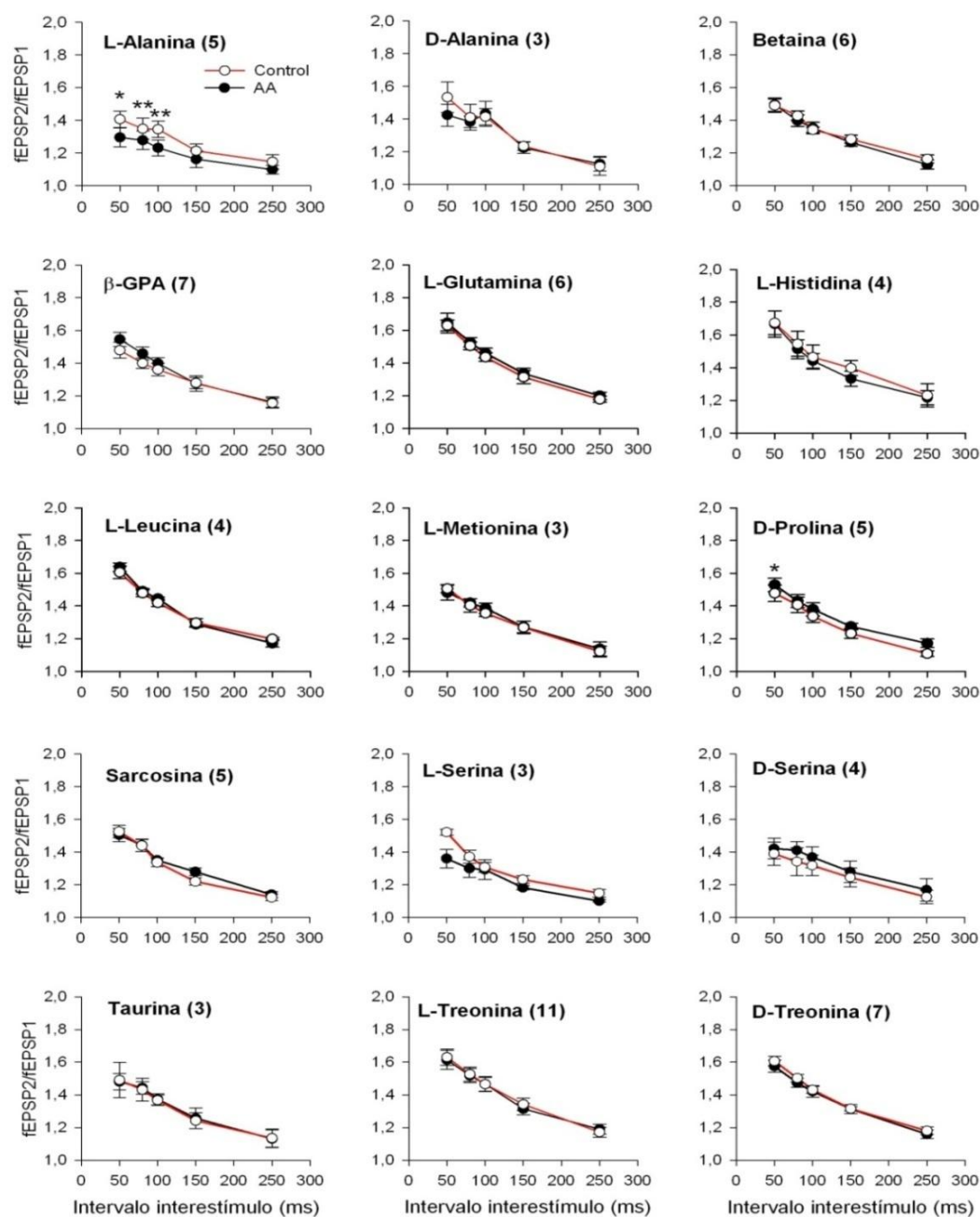


Fig. 4.8. Los aminoácidos no alteran, en general, la probabilidad de liberación de neurotransmisor. Cada gráfico muestra el cociente del fEPSP del segundo pulso entre el fEPSP del primer pulso, habiendo una diferencia de 50, 80, 100, 150 y 250 milisegundos entre ambos pulsos. Los círculos blancos corresponden a los pares de pulsos aplicados al menos 20 minutos antes de suministrar el aminoácido y los puntos negros a los pares de pulsos registrados una vez acabada la hora del periodo de lavado. Se compararon ambas situaciones para cada intervalo y cada aminoácido, y se realizó el t-test pareado para identificar diferencias. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Este protocolo se aplicó en casi todos los aminoácidos para una situación control, previa a la administración de la sustancia, y para una situación posterior a la hora de lavado del compuesto. En la inmensa mayoría no se aprecia ninguna diferencia en todos los intervalos probados. Las únicas excepciones son un pequeño incremento del cociente en el intervalo de 50 ms de D-prolina y una reducción del cociente en los intervalos de 50, 80 y 100 ms para L-alanina. En el resto no hay ninguna modificación en la probabilidad de liberación de neurotransmisor.

4.1.5. Efecto de la aplicación de aminoácidos sobre las propiedades intrínsecas de la membrana neuronal

Hasta ahora hemos visto como la aplicación de diversos aminoácidos a concentraciones de 10 mM es capaz de alterar los potenciales poblacionales, tanto el fEPSP como el FV, pero no sabemos si estas variaciones se traducen también en cambios a nivel intracelular o solo son debidos a efectos de campo que provocan alteraciones del flujo de las corrientes extracelulares. Para esclarecer este punto, realizamos unos experimentos en los que registramos la actividad intracelular al aplicar el aminoácido L-treonina durante 20 minutos y su posterior lavado de 30 minutos. En trabajos previos en nuestro laboratorio ya describimos el efecto producido por la taurina en los potenciales intracelulares, ahora hemos escogido hacer registros intracelulares mientras se aplica L-treonina porque es uno de los aminoácidos con mayor efecto potenciador que no comparte ningún transportador conocido con taurina y además no estimula los receptores NMDA.

Evaluamos los cambios que se producían en el EPSP intracelular al mismo tiempo que se registraba el potencial extracelular fEPSP (Fig. 4.9A). El EPSP sufrió una depresión al inicio de la aplicación ($68,2 \pm 17,3\%$, media de los minutos 4 a 8 de aplicación), que pudo ser debido a la despolarización que sufrió el V_m , lo cual redujo la fuerza electromotriz del EPSP, o por un aumento del potencial inhibitorio postsináptico (IPSP, por sus siglas en inglés). Esta depresión no se reflejó en su homólogo poblacional el cual creció desde la entrada del aminoácido, aunque el potencial intracelular recuperó niveles basales y empezó a potenciarse antes de la retirada del aminoácido. Ambos alcanzaron un máximo al principio de la fase de lavado pero, mientras que el valor poblacional permaneció potenciado tras 30 minutos de lavado, el valor intracelular volvió a valores basales antes de completar esta fase.

Durante la aplicación de la L-treonina también se apreciaron cambios tanto en el Vm como en la Rin (Fig. 4.9B). El Vm se despolarizó al inicio de la aplicación llegando esta despolarización a un valor de $6,2 \pm 2$ mV, durante los últimos 5 minutos de aplicación. Sin embargo, al retirarlo del medio, el Vm volvió rápidamente a valores basales e incluso se hiperpolarizó ligeramente ($-1,9 \pm 1,7$ mV). La Rin también sufrió cambios justo con la entrada del aminoácido llegando a aumentar hasta un $127,7 \pm 12,9\%$ al final de la aplicación. Al retirar la L-treonina del medio, la Rin también retomó sus valores basales.

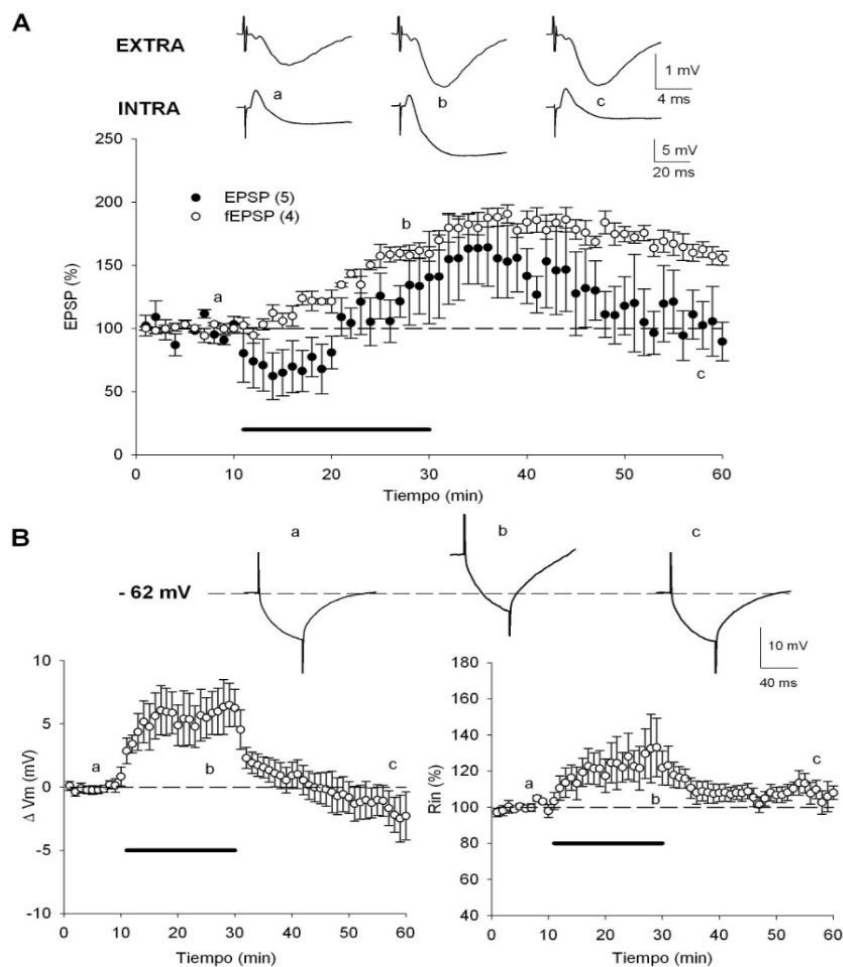


Fig. 4.9. La aplicación de L-treonina modifica las propiedades eléctricas de la membrana pero estos cambios no se mantienen durante el lavado. (A) Curso temporal de los cambios provocados por la aplicación de 10 mM de L-treonina en el EPSP intracelular y el fEPSP, registrados simultáneamente en las mismas rodajas. En la parte superior se muestran trazados de fEPSP y EPSP registrados en un experimento representativo en los momentos indicados con letras en la figura del curso temporal. (B) En los experimentos mostrados en A también se registraron los cambios de Vm (izquierda) y de Rin (derecha). Los trazados muestran las deflexiones causadas por los pulsos hiperpolarizantes que se

utilizaron para estimar R_{in} . El potencial de membrana en reposo de esta neurona fue de -62 mV (línea discontinúa).

Estos experimentos muestran que la aplicación de L-treonina 10 mM provoca cambios no duraderos en las propiedades intrínsecas de la membrana y que las modificaciones del EPSP intracelular vuelven a valores basales antes que los fEPSP obtenidos con el registro poblacional de campo.

4.1.6. Cantidad de los aminoácidos acumulados en la rodaja y su relación con el efecto de potenciación sináptica

Dada nuestra propuesta de que el transporte de aminoácidos es el mecanismo que media la potenciación sináptica producida por los aminoácidos, también estudiamos si los aminoácidos aplicados se acumulaban en las rodajas al final de los experimentos.

En el primer apartado ya mostramos las diferencias en la acumulación de los aminoácidos que se estudiaron a diferentes concentraciones. Aquí ampliamos el estudio utilizando el mismo método de análisis para el resto de los aminoácidos aplicados (tabla 4.1).

En este estudio se puede observar que el contenido total de los aminoácidos en una rodaja viene determinado principalmente por la cantidad acumulada del aminoácido aplicado, aunque hay unas pocas excepciones donde el contenido de aminoácidos sin contar el aplicado se modificó significativamente. Este es el caso de glicina que incrementa significativamente el contenido total del resto de aminoácidos ($6,5 \pm 0,8$ nmol/rodaja; $p = 0,031$; t-test) destacando el aumento de la cantidad de serina ($2,5 \pm 0,4$ nmol/rodaja). Glutamina también incrementa el contenido total del resto de aminoácidos hasta en $5,8 \pm 2,1$ nmol/rodaja ($p = 0,015$; t-test) lo que es más de la mitad de la propia glutamina acumulada ($8,5 \pm 0,9$ nmol/rodaja). De este incremento producido por glutamina destaca sobre todo el que produce en glutamato ($3 \pm 1,3$ nmol/rodaja) y aspartato ($2,2 \pm 0,6$ nmol/rodaja). Hubo otros aminoácidos que lo que provocaron fue una disminución del contenido total del resto de aminoácidos presentes en la rodaja como hizo L-histidina ($4,8 \pm 1,7$ nmol/rodaja; $p = 0,030$; t-test) y L-treonina ($4,7 \pm 1$ nmol/rodaja; $p = 0,005$; t-test), aunque en ambos casos esta disminución se vio con creces compensada por la acumulación del aminoácido aplicado. Estas modificaciones en el contenido endógeno de los aminoácidos de la

rodaja posiblemente sean debidas, entre otros factores, a que el aminoácido exógeno aplicado afecte al proceso de captación, a la liberación al espacio extracelular o al metabolismo de los aminoácidos afectados o a sus sustratos.

En la tabla 4.1 se puede observar que los aminoácidos no potenciadores como L-valina o L-leucina apenas se acumulan al finalizar la fase de lavado, lo que contrasta con los altos niveles de acumulación de aminoácidos potenciadores. En algunos, como L-histidina, se llega a acumular hasta más de 40 nmol/rodaja respecto a la cantidad que muestran en condiciones control.

Tabla 4.1. **Contenido de aminoácidos en las rodajas tratadas con aminoácidos individuales.** La fila superior indica el aminoácido aplicado a la concentración de 10 mM. La primera columna indica el aminoácido analizado. La columna Control denota la perfusión de solución KRB sin aminoácidos. En el resto de celdas se representa el contenido del aminoácido analizado en nmol/rodaja, seguido de la significancia estadística calculada al comparar cada situación frente al control mediante un t-test o el test de Mann-Whitney y el número de experimentos utilizados. Para aquellos que muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) se marca la casilla de color azul (mayor que el control) o verde (menor que el control).

EXP	CONTROL	L-Ala	D-Ala	L-Arg	Bet	B-GPA	L-Gln	Gly	L-His	L-Leu	L-Met	L-Pro	D-Pro	Sar	L-Ser	D-Ser	Tau	L-Thr	D-Thr	L-Val
Asp	4,50±0.14 n = 14	4,88±0.18 p = 0.123 n = 6	3,96±0.40 p = 0.102 n = 4	4,69±0.76 p = 0.890 n = 5	3,76±0.26 p = 0.010 n = 9	3,59±0.25 p = 0.002 n = 10	6,74±0.56 p < 0.001 n = 8	5,22±0.32 p = 0.040 n = 3	2,52±0.24 p < 0.001 n = 8	3,61±0.21 p = 0.001 n = 12	3,50±0.15 p < 0.001 n = 6	5,02±0.22 p = 0.116 n = 4	5,55±0.76 p = 0.197 n = 9	4,94±0.53 p = 0.251 n = 6	4,10±0.48 p = 0.677 n = 5	4,00±0.49 p = 0.158 n = 4	4,50±0.24 p = 0.921 n = 12	3,20±0.25 p = 0.021 n = 22	4,27±0.38 p = 0.508 n = 9	5,16±0.46 p = 0.248 n = 7
Glu	15,09±0.85 n = 14	17,35±0.87 p = 0.113 n = 6	15±0.82 p = 0.957 n = 4	14,74±2.41 p = 0.852 n = 3	11,55±0.70 p = 0.006 n = 9	12,33±0.54 p = 0.016 n = 10	18,13±1.26 p = 0.063 n = 8	14,97±1.07 p = 0.949 n = 3	10,32±0.51 p < 0.001 n = 8	11,98±0.59 p = 0.006 n = 12	12,13±0.79 p = 0.041 n = 6	12,23±0.57 p = 0.137 n = 3	16,14±1.59 p = 0.511 n = 9	14,41±1.18 p = 0.644 n = 6	12,82±1.32 p = 0.160 n = 5	14,10±1.92 p = 0.582 n = 4	14,17±0.42 p = 0.346 n = 12	11,83±0.64 p = 0.001 n = 22	13,48±0.82 p = 0.193 n = 9	15,69±0.90 p = 0.716 n = 7
Ser	1,82±0.09 n = 14	1,80±0.17 p = 0.893 n = 6	2,01±0.26 p = 0.361 n = 4	1,73±0.32 p = 0.677 n = 5	2,51±0.52 p = 0.018 n = 9	2,32±0.20 p = 0.014 n = 10	2,45±0.53 p = 0.232 n = 6	4,32±0.38 p < 0.001 n = 3	2,13±0.34 p = 0.254 n = 8	2,36±0.32 p = 0.136 n = 7	2,23±0.38 p = 0.378 n = 3	2,60±0.22 p = 0.002 n = 3	1,88±0.13 p = 0.693 n = 9	2,43±0.21 p = 0.003 n = 6	33,68±2.68 p = 0.001 n = 5	40,20±6.86 p < 0.001 n = 4	2,35±0.26 p = 0.341 n = 12	1,75±0.19 p = 0.742 n = 13	1,35±0.04 p = 0.013 n = 4	2,58±0.40 p = 0.057 n = 7
Gln	0,47±0.03 n = 14	2,13±0.24 p < 0.001 n = 6	0,79±0.14 p < 0.001 n = 4	0,38±0.03 p = 0.077 n = 5	0,55±0.06 p = 0.235 n = 9	0,63±0.03 p < 0.001 n = 10	8,49±0.88 p < 0.001 n = 8	1,20±0.16 p < 0.001 n = 3	1,37±0.15 p < 0.001 n = 8	0,26±0.04 p < 0.001 n = 7	0,37±0.03 p = 0.117 n = 3	0,61±0.04 p = 0.038 n = 3	0,40±0.04 p = 0.113 n = 9	0,50±0.060 p = 0.559 n = 6	0,85±0.12 p = 0.003 n = 5	0,55±0.05 p = 0.147 n = 4	0,57±0.04 p = 0.045 n = 12	0,61±0.03 p = 0.003 n = 13	0,85±0.18 p = 0.038 n = 4	0,41±0.05 p = 0.206 n = 7
His	0,14±0.01 n = 14	0,10±0.02 p = 0.135 n = 6	0,12±0.00 p = 0.556 n = 4	0,19±0.03 p = 0.247 n = 5	0,22±0.04 p = 0.072 n = 9	0,12±0.02 p = 0.314 n = 10	0,16±0.05 p = 0.621 n = 6	0,19±0.03 p = 0.115 n = 3	44,83±1.60 p < 0.001 n = 8	0,13±0.03 p = 0.697 n = 10	0,26±0.04 p = 0.002 n = 3	0,21±0.10 p = 0.313 n = 9	0,17±0.01 p = 0.120 n = 9	0,23±0.03 p = 0.004 n = 6	0,14±0.04 p = 0.870 n = 5	0,15±0.05 p = 0.701 n = 4	0,15±0.02 p = 0.463 n = 12	0,15±0.02 p = 0.932 n = 22	0,18±0.02 p = 0.089 n = 9	0,22±0.06 p = 0.279 n = 7
Gly	1,51±0.14 n = 14	1,92±0.29 p = 0.148 n = 6	2,03±0.24 p = 0.084 n = 4	1,38±0.04 p = 0.580 n = 5	2,95±0.55 p = 0.001 n = 3	2,41±0.28 p = 0.003 n = 10		39,30±1.38 p < 0.001 n = 3	2,12±0.36 p = 0.060 n = 8	2,51±0.48 p = 0.008 n = 4	2,28±0.11 p = 0.024 n = 3	3,55±0.11 p < 0.001 n = 9	1,61±0.24 p = 0.725 n = 9	1,59±0.45 p = 0.343 n = 6	3,81±0.19 p = 0.870 n = 5	2,13±0.37 p = 0.057 n = 4	1,72±0.11 p = 0.325 n = 8	2,14±0.28 p = 0.089 n = 22	1,44±0.09 p = 0.804 n = 9	2,24±0.32 p = 0.017 n = 7
Thr	0,68±0.05 n = 14	0,45±0.02 p = 0.009 n = 6	0,68±0.06 p = 0.975 n = 4	0,40±0.03 p = 0.005 n = 5	0,57±0.07 p = 0.221 n = 9	0,70±0.06 p = 0.829 n = 10		1,12±0.13 p = 0.002 n = 3	0,71±0.09 p = 0.713 n = 4	0,47±0.06 p = 0.014 n = 9	0,64±0.12 p = 0.747 n = 3	0,72±0.14 p = 0.730 n = 4	0,76±0.11 p = 0.455 n = 9	0,87±0.08 p = 0.051 n = 6	0,66±0.06 p = 0.775 n = 5	0,55±0.06 p = 0.209 n = 4	0,65±0.13 p = 0.799 n = 8	19,43±0.95 p < 0.001 n = 21	13,30±0.86 p < 0.001 n = 8	0,39±0.09 p = 0.006 n = 7
Arg	0,24±0.02 n = 14	0,26±0.04 p = 0.620 n = 6	0,32±0.07 p = 0.091 n = 4	2,89±0.61 p < 0.001 n = 5	0,23±0.06 p = 0.975 n = 9	0,27±0.03 p = 0.379 n = 10	0,05±0.02 p < 0.001 n = 8	0,30±0.09 p = 0.235 n = 3	0,35±0.04 p = 0.005 n = 8	0,21±0.03 p = 0.378 n = 12	0,25±0.01 p = 0.826 n = 3	0,24±0.02 p = 0.950 n = 3	0,34±0.04 p = 0.010 n = 9	0,23±0.03 p = 0.926 n = 6	0,24±0.01 p = 0.840 n = 5	0,31±0.02 p = 0.063 n = 4	0,21±0.04 p = 0.475 n = 11	0,19±0.02 p = 0.055 n = 20	0,23±0.05 p = 0.875 n = 9	0,26±0.05 p = 0.553 n = 7
Tau	5,22±0.27 n = 14	4,70±0.33 p = 0.256 n = 6	5,56±0.61 p = 0.552 n = 4	5,05±0.56 p = 0.753 n = 5	5,79±0.73 p = 0.777 n = 9	4,88±0.28 p = 0.381 n = 10	4,35±0.35 p = 0.055 n = 8	5,77±0.36 p = 0.365 n = 3	5,09±0.37 p = 0.771 n = 8	5,32±0.27 p = 0.777 n = 12	6,47±0.39 p = 0.014 n = 6	4,35±0.29 p = 0.160 n = 3	5,21±0.49 p = 0.981 n = 9	4,87±0.70 p = 0.552 n = 6	4,30±0.69 p = 0.123 n = 5	5,34±0.89 p < 0.001 n = 4	31,92±1.29 p < 0.001 n = 12	4,53±0.18 p = 0.031 n = 21	6,50±0.34 p = 0.007 n = 8	5,12±0.22 p = 0.806 n = 7
Ala	1,00±0.07 n = 14	16,08±1.48 p < 0.001 n = 6	40,25±3.36 p < 0.001 n = 4	1,09±0.24 p = 0.642 n = 5	0,99±0.07 p = 0.904 n = 9	0,96±0.06 p = 0.633 n = 10	1,47±0.08 p < 0.001 n = 8	1,67±0.15 p < 0.001 n = 3	1,34±0.14 p = 0.021 n = 8	0,84±0.04 p = 0.066 n = 12	0,99±0.14 p = 0.939 n = 6	1,09±0.05 p = 0.608 n = 3	1,15±0.16 p = 0.592 n = 9	1,26±0.10 p = 0.051 n = 6	1,43±0.09 p = 0.004 n = 5	1,24±0.11 p = 0.112 n = 4	1,10±0.08 p = 0.345 n = 12	1,00±0.11 p = 0.127 n = 22	0,72±0.08 p = 0.008 n = 9	1,53±0.14 p = 0.001 n = 7
Tyr	0,13±0.01 n = 14	0,11±0.01 p = 0.281 n = 6	0,12±0.02 p = 0.713 n = 4	0,16±0.05 p = 0.963 n = 5	0,16±0.02 p = 0.185 n = 9	0,12±0.02 p = 0.721 n = 10	0,09±0.02 p = 0.052 n = 8	0,14±0.03 p = 0.702 n = 3	0,19±0.03 p = 0.021 n = 8	0,11±0.01 p = 0.300 n = 12	0,17±0.03 p = 0.133 n = 6	0,14±0.02 p = 0.789 n = 3	0,18±0.02 p = 0.022 n = 8	0,26±0.03 p < 0.001 n = 6	0,14±0.02 p = 0.353 n = 5	0,14±0.01 p = 0.817 n = 4	0,12±0.01 p = 0.354 n = 12	0,16±0.02 p = 0.845 n = 21	0,17±0.08 p = 0.084 n = 9	0,14±0.02 p = 0.683 n = 6
GABA	1,77±0.10 n = 14	1,80±0.29 p = 0.878 n = 6	1,49±0.26 p = 0.215 n = 4	1,76±0.13 p = 0.959 n = 5	1,32±0.14 p = 0.015 n = 9	0,76±0.07 p = 0.001 n = 10	1,66±0.25 p = 0.628 n = 8	1,91±0.22 p = 0.521 n = 3	1,56±0.14 p = 0.210 n = 8	1,59±0.19 p = 0.375 n = 12	2,10±0.15 p = 0.070 n = 6	1,23±0.07 p = 0.024 n = 3	1,16±0.15 p = 0.001 n = 9	0,92±0.12 p < 0.001 n = 6	1,75±0.32 p = 0.331 n = 5	2,13±0.29 p = 0.118 n = 4	1,38±0.12 p = 0.016 n = 12	1,27±0.08 p = 0.001 n = 22	2,00±0.11 p = 0.126 n = 9	1,44±0.22 p = 0.116 n = 7
Met	0,08±0.01 n = 7			0,09±0.01 p = 0.597 n = 5	0,09±0.01 p = 0.632 n = 6		0,08±0.01 p = 0.597 n = 5		0,09±0.01 p = 0.708 n = 3	0,11±0.00 p = 0.029 n = 8	0,81±0.16 p < 0.001 n = 3		0,10±0.00 p = 0.170 n = 5	0,04±0.01 p = 0.006 n = 5	0,29±0.01 p = 0.001 n = 5	0,21±0.02 p = 0.751 n = 4	0,08±0.01 p = 0.499 n = 4	0,07±0.01 p = 0.447 n = 7	0,11±0.04 p = 0.353 n = 4	0,04±0.01 p = 0.010 n = 3
Val	0,23±0.04 n = 13	0,17±0.01 p = 0.353 n = 6	0,16±0.03 p = 0.401 n = 4	0,13±0.01 p = 0.395 n = 4	0,16±0.06 p = 0.114 n = 6	0,18±0.02 p = 0.344 n = 10	0,29±0.05 p = 0.506 n = 6	0,34±0.05 p = 0.279 n = 3	0,18±0.04 p = 0.399 n = 7	0,44±0.09 p = 0.068 n = 12	0,40±0.08 p = 0.063 n = 6	0,33±0.01 p = 0.350 n = 3	0,24±0.07 p = 0.554 n = 5	0,13±0.07 p = 0.076 n = 5	0,29±0.01 p = 0.001 n = 5	0,21±0.02 p = 0.751 n = 4	0,16±0.03 p = 0.134 n = 12	0,19±0.02 p = 0.969 n = 19	0,35±0.11 p = 0.310 n = 8	0,69±0.12 p = 0.001 n = 5
Phe	0,13±0.01 n = 14	0,16±0.02 p = 0.253 n = 6	0,13±0.02 p = 0.935 n = 4	0,10±0.01 p = 0.689 n = 5	0,18±0.02 p = 0.027 n = 9	0,19±0.02 p = 0.064 n = 10	0,20±0.03 p = 0.012 n = 7	0,30±0.17 p = 0.413 n = 3	0,19±0.01 p = 0.009 n = 7	0,18±0.02 p = 0.028 n = 12	0,16±0.01 p = 0.136 n = 6	0,28±0.01 p = 0.001 n = 3	0,13±0.00 p = 0.824 n = 5	0,13±0.04 p = 0.201 n = 6	0,29±0.01 p < 0.001 n = 5	0,20±0.04 p = 0.029 n = 4	0,15±0.01 p = 0.246 n = 11	0,20±0.02 p = 0.003 n = 20	0,15±0.04 p = 0.346 n = 8	0,19±0.03 p = 0.002 n = 5
Ile	0,14±0.01 n = 14	0,11±0.01 p = 0.112 n = 6	0,13±0.02 p = 0.572 n = 4	0,08±0.01 p = 0.200 n = 4	0,17±0.02 p = 0.126 n = 9	0,12±0.02 p = 0.927 n = 10	0,17±0.02 p = 0.132 n = 6	0,28±0.01 p < 0.001 n = 3	0,14±0.02 p = 0.957 n = 7	0,19±0.02 p = 0.045 n = 12	0,18±0.03 p = 0.065 n = 6	0,17±0.01 p = 0.171 n = 3	0,15±0.00 p = 0.364 n = 5	0,13±0.01 p = 0.809 n = 5	0,17±0.02 p = 0.089 n = 5	0,14±0.02 p = 0.928 n = 4	0,15±0.01 p = 0.553 n = 12	0,13±0.01 p = 0.614 n = 19	0,13±0.01 p = 0.663 n = 8	0,15±0.03 p = 0.307 n = 5
Leu	0,15±0.01 n = 14	0,20±0.03 p = 0.042 n = 6	0,19±0.03 p = 0.162 n = 4	0,16±0.01 p = 0.179 n = 5	0,19±0.05 p = 0.950 n = 9	0,28±0.03 p = 0.003 n = 10	0,23±0.05 p = 0.018 n = 6	0,33±0.14 p = 0.020 n = 3	0,21±0.01 p = 0.029 n = 7	0,33±0.02 p < 0.001 n = 12	0,27±0.01 p < 0.001 n = 6	0,33±0.01 p < 0.001 n = 3	0,17±0.01 p = 0.320 n = 5	0,13±0.05 p = 0.651 n = 4	0,34±0.04 p < 0.001 n = 5	0,28±0.09 p = 0.049 n = 4	0,18±0.01 p = 0.094 n = 12	0,55±0.03 p = 0.0101 n = 18	0,17±0.01 p = 0.151 n = 7	0,22±0.08 p = 0.179 n = 5

Para comprobar si existe una relación entre la magnitud de la potenciación del fEPSP alcanzada al final del experimento y el contenido total de aminoácidos en ese mismo momento, calculamos el coeficiente de correlación de Pearson para ambos parámetros y obtuvimos un valor de $R = 0,67(p < 0,001)$ (Fig. 4.10). Para esta comparación, solo utilizamos aquellas rodajas en las que se realizó tanto el registro electrofisiológico como el análisis de aminoácidos. Si comparamos con la cantidad de aminoácido aplicado acumulada en vez del contenido total la correlación positiva se mantiene e incluso es un poco mejor ($R = 0,73; p < 0,001$)

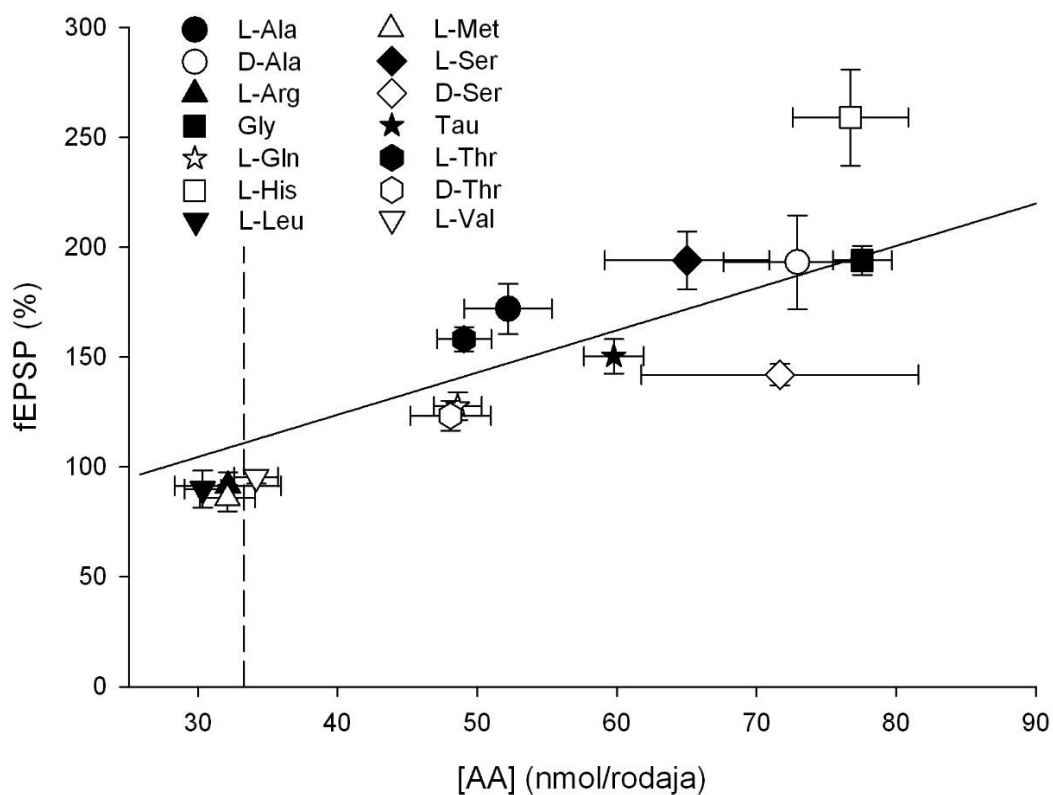


Fig. 4.10. **La potenciación del fEPSP está correlacionada con el incremento del contenido total de los aminoácidos.** En la parte superior izquierda del gráfico se refleja el símbolo asignado a cada aminoácido representado. El grado de potenciación del fEPSP es la media de los últimos diez minutos de lavado de los experimentos mostrados en la Fig. 4.3 y Fig. 4.4. Se representa el contenido total medio de aminoácidos presente en esas mismas rodajas. La recta representada se obtiene al ajustar los valores de los experimentos individuales que dan lugar a los puntos medios mostrados, a la ecuación de una recta ($f = y_0 + a \cdot x$) y con estos valores también se calculó el coeficiente de correlación de Pearson ($R = 0,67$). La línea discontinua muestra la cantidad media de aminoácidos presente en las rodajas control ($n = 14$).

En resumen, en este capítulo hemos demostrado que un gran número de aminoácidos son capaces de reproducir el efecto de potenciación previamente descrito para la taurina. Las diferentes características de estos aminoácidos potenciadores hacen muy improbable que sea un único transportador el responsable de mediar este fenómeno de potenciación sináptica y en ningún caso parece estar implicado el transportador PAT1. Además, parece existir una estrecha relación entre el nivel de acumulación del aminoácido y el grado de potenciación alcanzado.

4.2. AUMENTO DEL VOLUMEN CELULAR INDUCIDO POR LA ACUMULACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Los experimentos mostrados en el capítulo anterior sugieren que la acumulación de aminoácidos a través de diferentes transportadores es capaz de potenciar el fEPSP (posiblemente por un mecanismo postsináptico) y el FV (potencial puramente axonal). Dada la complejidad que significa la localización de diferentes transportadores en axones y dendritas, y en ambos casos ligados a una maquinaria de señalización causante de la potenciación, nos planteamos la existencia de un mecanismo más simple. La acumulación intracelular de aminoácidos podría conducir a un incremento de la concentración osmótica de la neurona lo que llevaría a una entrada pasiva de agua dando lugar a un hinchamiento celular. En el tejido cerebral, el aumento de volumen celular lleva asociado una disminución del espacio extracelular lo que produce incrementos de los potenciales de campo registrados extracelularmente (Chebabo et al., 1995a), como es el caso de los fEPSP y FV registrados en nuestros experimentos. En este capítulo hemos llevado a cabo una serie de experimentos para esclarecer si las modificaciones del volumen celular contribuyen en los procesos de potenciación sináptica inducidos por los aminoácidos.

4.2.1. Aplicación de los aminoácidos en un medio hiperosmótico

La primera aproximación que realizamos fue la de dificultar el hinchamiento celular aumentando la osmolaridad del medio de perfusión, para ello seguimos el mismo protocolo de aplicación de aminoácidos utilizado en el capítulo anterior, pero

en esta ocasión utilizando un KRB que se hizo hiperosmótico al añadir 30 mM de sacarosa ($327,1 \pm 0,6$ mOsm; $n = 18$). La aplicación del KRB hiperosmótico produjo una rápida reducción del fEPSP ($24,8 \pm 2,8\%$; $n = 15$) y del FV ($19,7 \pm 2,5\%$; $n = 15$) tras lo cual incrementamos la intensidad de estimulación hasta lograr obtener potenciales con tamaños similares a los basales (datos no mostrado). En estos experimentos solo utilizamos los aminoácidos potenciadores que serían los que provocarían el incremento de volumen celular.

En la Fig. 4.11 se pueden observar los cursos temporales del fEPSP y del FV de los aminoácidos potenciadores en este medio hiperosmótico. El efecto de los aminoácidos en este medio fue muy similar al obtenido en un medio isosmótico, en todos ellos alcanzaron el máximo de potenciación al inicio del periodo de lavado y mantuvieron esta potenciación por encima del 20% del fEPSP tras la hora de retirada del aminoácido. Las mayores diferencias con la situación isosmótica se encontraron durante la aplicación de D-alanina y L-serina donde el fEPSP se redujo desde el comienzo de la administración recuperándose hacia el final de esta fase con el medio hiperosmótico. Esta falta de cambios en los cursos temporales del FV y el fEPSP entre las distintas osmolaridades se reflejó también en el curso temporal de la eficacia sináptica (Fig. 4.12).

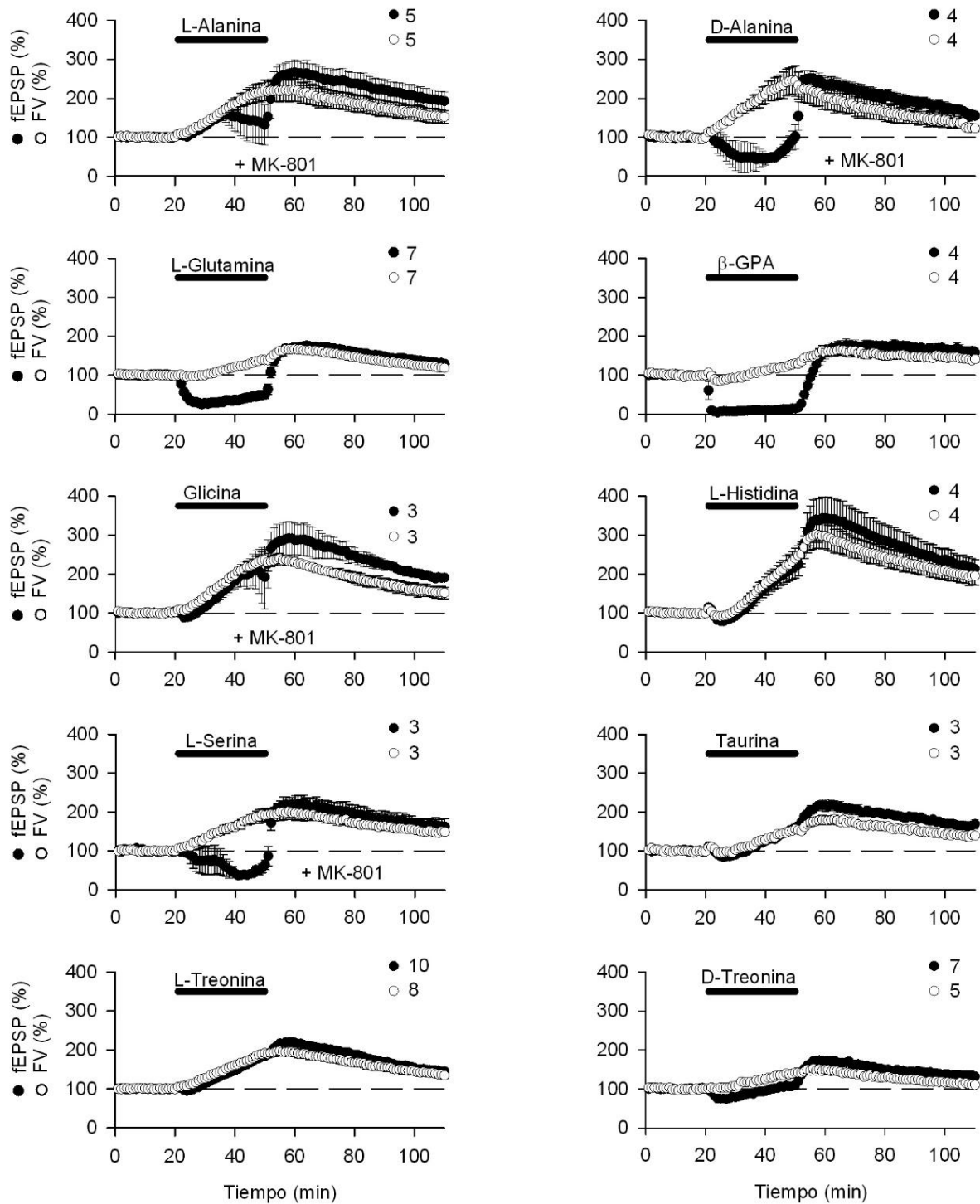


Fig. 4.11. **Efecto de los aminoácidos sobre el fEPSP y el FV en un medio hiperosmótico.** Los experimentos se realizaron en la continua presencia de un KRB hecho hiperosmótico añadiendo 30 mM de sacarosa. El número de experimentos viene reflejado en cada gráfico junto al círculo correspondiente. “+ MK-801” indica que este antagonista NMDA fue aplicado durante todo el experimento a una concentración de 10 μ M y antes del periodo basal se administró junto a NMDA 20 μ M durante 10 min para que el MK-801 pudiera bloquear al receptor.

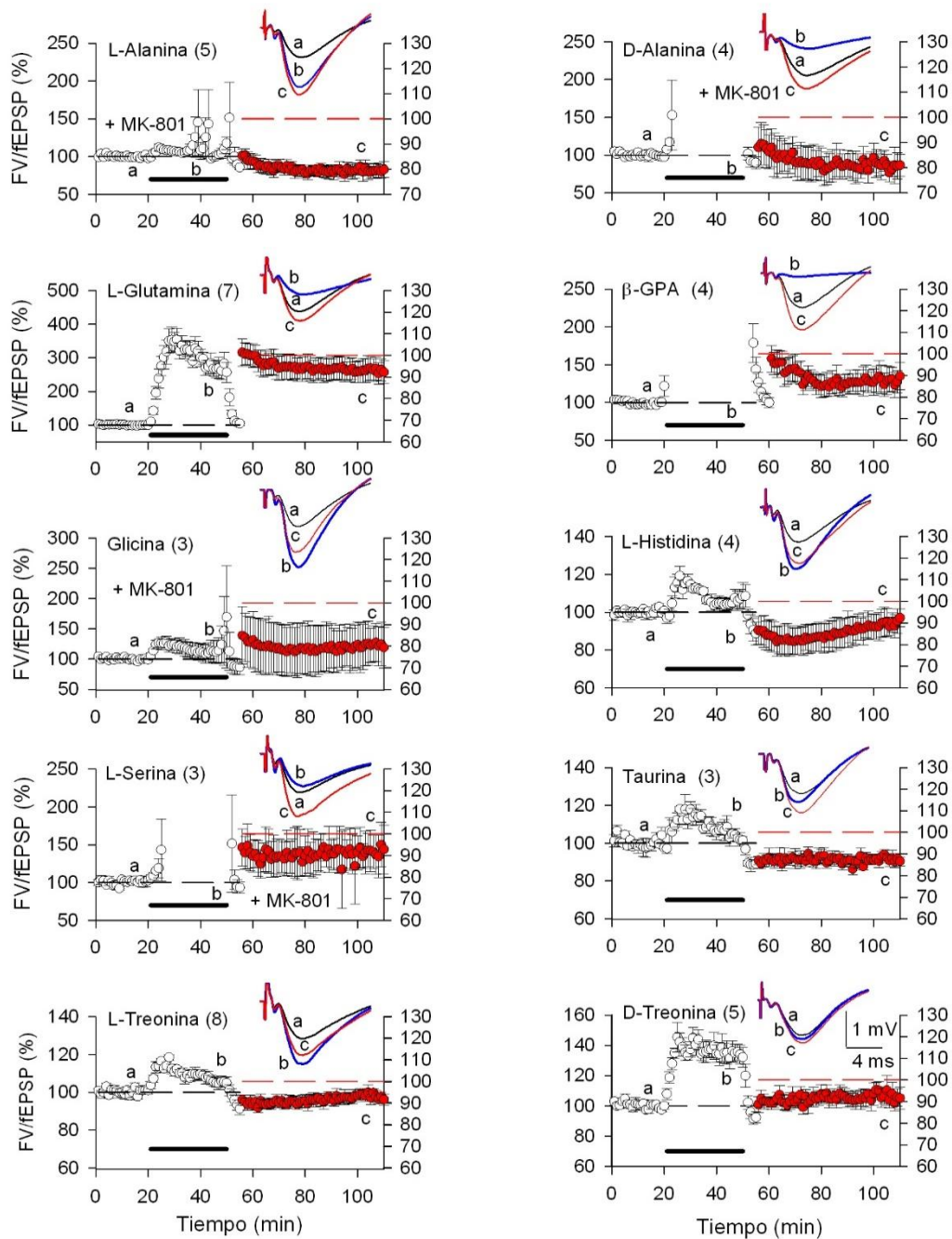


Fig.4.12. Curso temporal de los cambios de la eficacia sináptica producidos por los aminoácidos en un medio hiperosmótico. Los círculos blancos muestran la media del curso temporal del cociente FV/fEPSP para los primeros 55 primeros minutos que comprenden el periodo basal, la aplicación del aminoácido y los primeros 5 minutos de lavado. El resto de la fase de lavado se muestra con círculos rojos. La escala de la primera parte depende del nivel de incremento del cociente para cada aminoácido mientras que la escala del lavado es la misma para todos con el fin de facilitar la comparación. En cada gráfico se muestran tres trazados representativos para diferentes momentos del curso temporal señalados por letras.

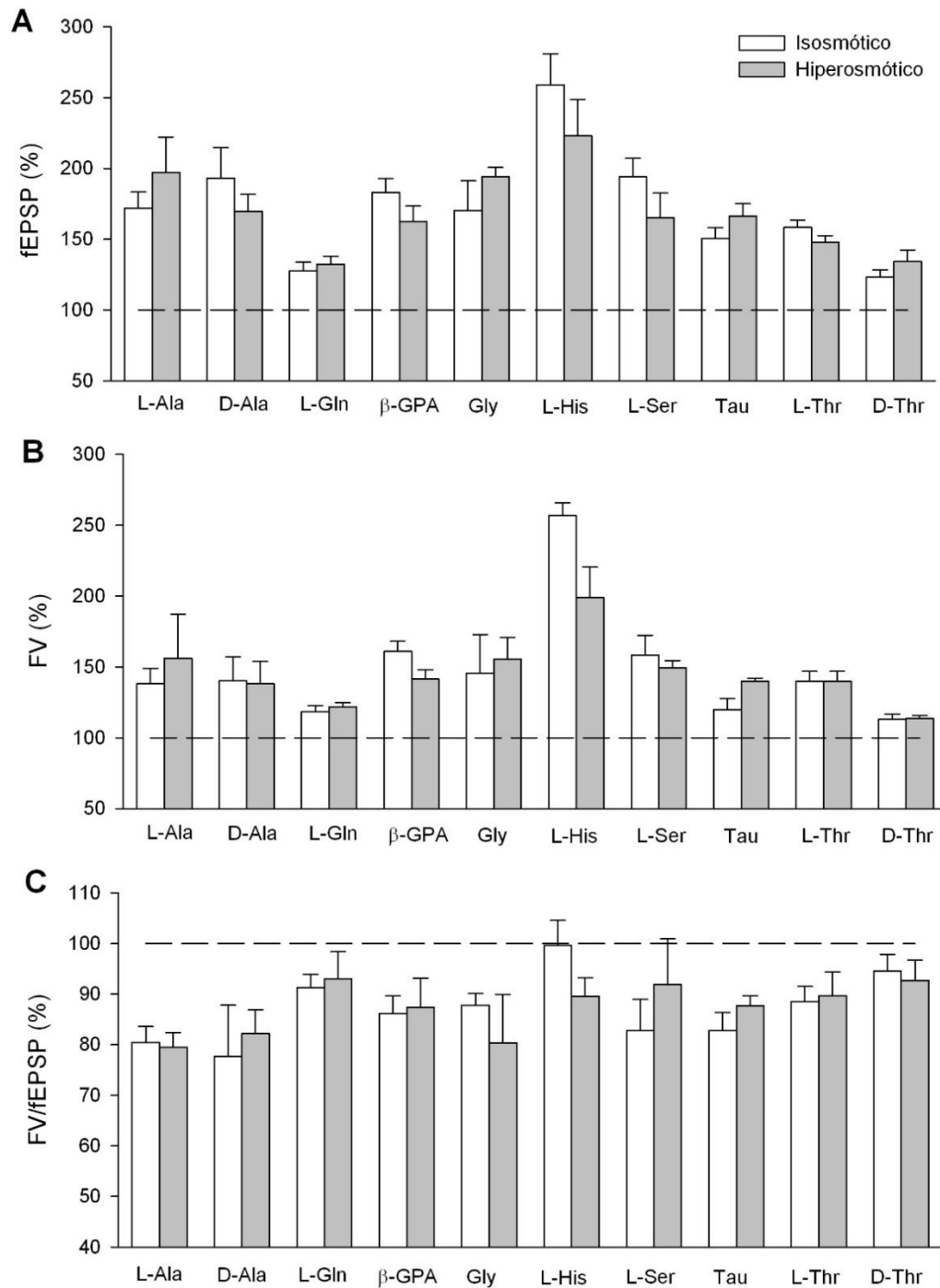


Fig. 4.13. Las condiciones hiperosmóticas no afectan los efectos provocados por diferentes aminoácidos sobre el fEPSP (A), el FV (B) y la eficacia sináptica (C). Cada barra representa la media de los últimos diez minutos de los cursos temporales de la Fig. 4.11 y Fig. 4.12. Las barras de color blanco muestran los datos obtenidos en condiciones isosmóticas ($295 \pm 0,2$ mOsm) y las de color gris en hiperosmóticas ($327,1 \pm 0,6$ mOsm). Para cada aminoácido se comparó la situación isosmótica frente a la situación hiperosmótica utilizando el t-test o el test de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

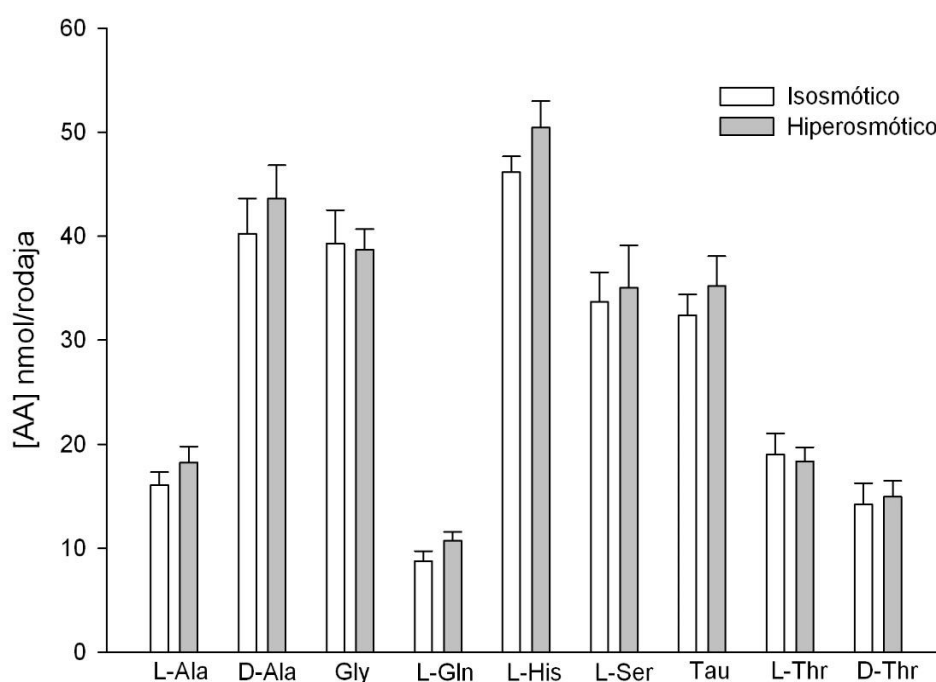


Fig. 4.14. **Comparación de la acumulación de aminoácidos en condiciones isosmóticas e hiperosmóticas.** Cada barra muestra el valor medio de los aminoácidos acumulados en las rodajas utilizadas en los experimentos para el estudio del fEPSP mostrados en la Fig. 4.3 y en la Fig. 4.11. Las comparaciones entre la situación isosmótica frente a la hiperosmótica se realizaron con el t-test o el test de Mann-Whitney.

En la Fig. 4.13 se puede apreciar que la magnitud de la potenciación alcanzada al final del periodo de lavado para los diferentes aminoácidos empleados es estadísticamente indistinguible entre las condiciones isosmóticas e hiperosmóticas. El medio hiperosmótico tampoco modificó estadísticamente la cantidad del aminoácido acumulado respecto a la situación isosmótica (Fig. 4.14).

Estos resultados podrían llevar a pensar que el aumento de volumen celular no está involucrado en los fenómenos de potenciación sináptica, al no verse modificados por la presencia de un medio hiperosmótico. Para estar seguros de que el método usado era el correcto para valorar la propuesta, realizamos unos experimentos en los que se provocaron aumentos del volumen celular al perfundir un medio hiposmótico.

Estos experimentos se realizaron disminuyendo gradualmente la osmolaridad del medio de perfusión mediante el aporte constante (1 ml/min) de agua destilada al recipiente que contenía un volumen conocido de KRB estándar (Fig. 4.15). De esta manera se consiguió una disminución gradual de la osmolaridad que se analizó cada 5

minutos en muestras de 20 μ l. El efecto de disminución de la osmolaridad sobre el fEPSP y el FV lo evaluamos en dos situaciones, partiendo de una osmolaridad normal ($295 \pm 0,2$ mOsm) y desde una situación de hiperosmolaridad ($327,1 \pm 0,6$ mOsm).

Tal como se puede observar en la Fig. 4.15, es indistinguible el cambio relativo en los valores normalizados del fEPSP y del FV producidos por idénticas reducciones de osmolaridad desde diferentes osmolaridades de partida. Estos resultados indican que en nuestros experimentos con la perfusión de aminoácidos en un medio hiperosmótico pueden seguir existiendo aumentos del volumen celular que influyan en el tamaño de los potenciales de campo como el fEPSP y el FV.

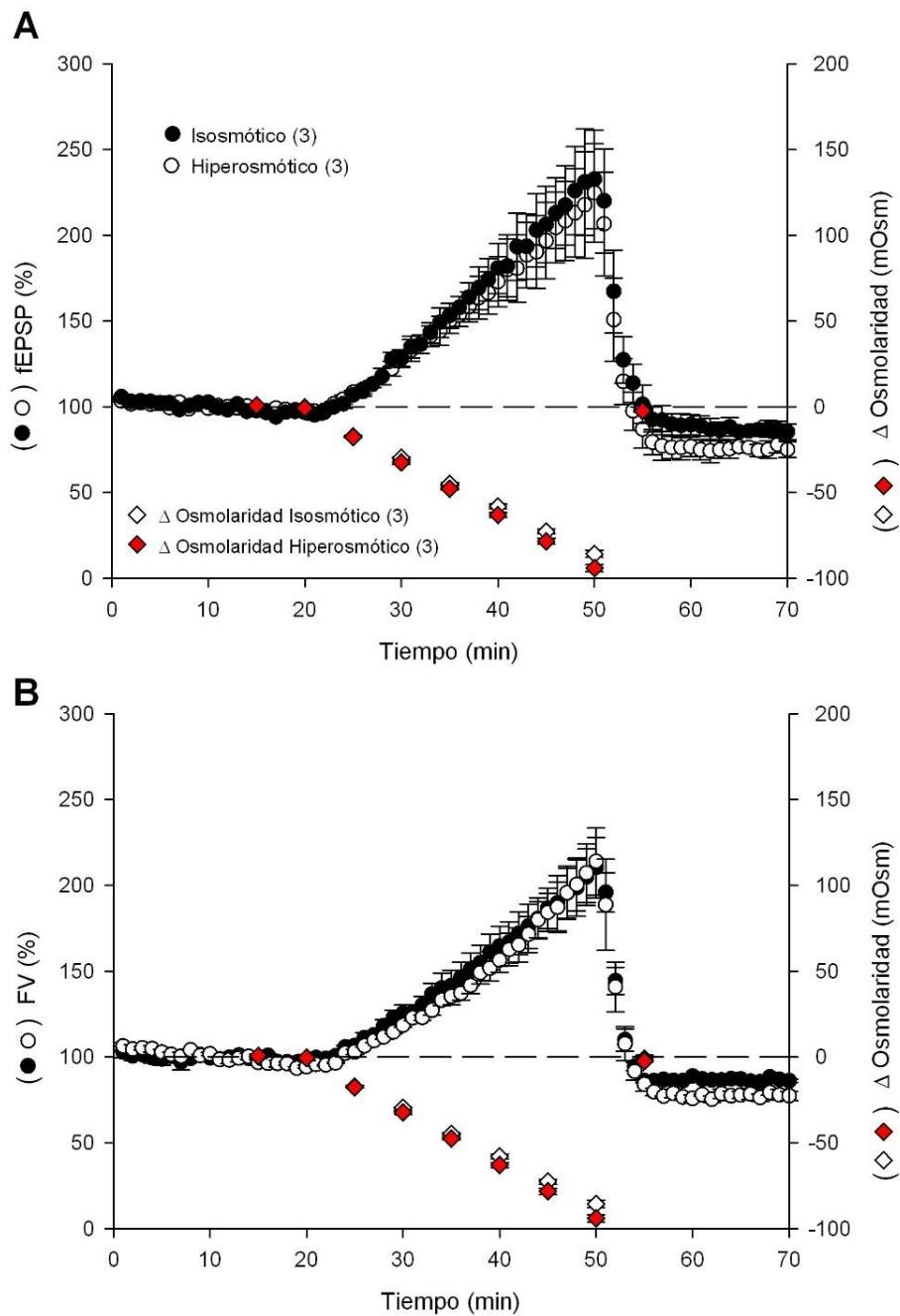


Fig. 4.15. Efecto sobre el fEPSP (A) y el FV (B) de la reducción gradual de la osmolaridad en medios que de partida son isosmóticos o hiperosmóticos. Los puntos y los rombos blancos corresponden a los experimentos en medio isosmótico, y los círculos negros y los rombos rojos a los experimentos en medio hiperosmótico. Los círculos muestran la media del curso temporal del fEPSP y el FV mientras que los rombos representan la media de la disminución de la osmolaridad. La osmolaridad se disminuyó gradualmente mediante el aporte constante (1 ml/min) de agua destilada al recipiente que contenía un volumen conocido de KRB estándar.

4.2.2. Estudio de los cambios en la resistividad del tejido producido por aminoácidos

Otra estrategia para estimar los cambios de volumen celular es la medida de los cambios de resistividad del tejido. Este parámetro está directamente relacionado con el volumen extracelular, viéndose incrementado si el volumen celular aumenta (Traynelis y Dingledine, 1989; Chebabo et al., 1995a,b). Para su estudio recurrimos a registrar los cambios que se producen en el voltaje provocado por pulsos monofásicos de baja intensidad que son insuficientes para provocar activación sináptica o axonal (al menos poblacional). Incrementos en este voltaje significarían un aumento de la resistividad y por tanto del volumen celular.

Inicialmente se comprobó la estabilidad de la medida de resistividad en experimentos hechos únicamente con los electrodos (de registro y de estimulación) situados en la cámara de registro sin rodaja de hipocampo mientras se perfundía la solución de KRB. En estos experimentos no se observó ningún cambio en la medida de la resistividad (Fig. 4.16A). También se hicieron otros experimentos con los electrodos dentro de la rodaja en sus posiciones habituales mientras se perfundía la solución de KRB. En este caso sí se observó que la resistividad aumentaba ligera y constantemente. Este pequeño incremento fue sustraído en los registros posteriores para obtener únicamente los cambios producidos por la aplicación de los aminoácidos.

Se estudió el cambio en la resistividad producido por la aplicación individual de tres aminoácidos, taurina y L-treonina como aminoácidos potenciadores, y L-leucina como aminoácido no potenciador. Utilizando el protocolo habitual, se aplicaron a la concentración de 10 mM durante 30 min (Fig. 4.16B). Tanto taurina como L-treonina produjeron un incremento de la resistividad durante la aplicación del aminoácido, siendo la aparición de este incremento más temprana en L-treonina y de mayor intensidad, como ocurre sobre el efecto del fEPSP. Al igual que sobre la respuesta postsináptica se alcanzó el máximo de resistividad al inicio del periodo de lavado y esta fue disminuyendo durante el mismo, pero quedando significativamente aumentada tras una hora de retirada de los aminoácidos ($107,9 \pm 1,9\%$ y $105,8 \pm 1,2\%$, para L-treonina y taurina respectivamente; $p < 0,001$ y $p = 0,002$ respecto a basal, test de Mann-Whitney). Por otra parte, la aplicación de L-leucina apenas produce variaciones

en la resistividad, no llegándose a apreciar diferencias significativas al finalizar la fase de lavado ($102,9 \pm 1,6\%$; $p = 0,178$; t-test).

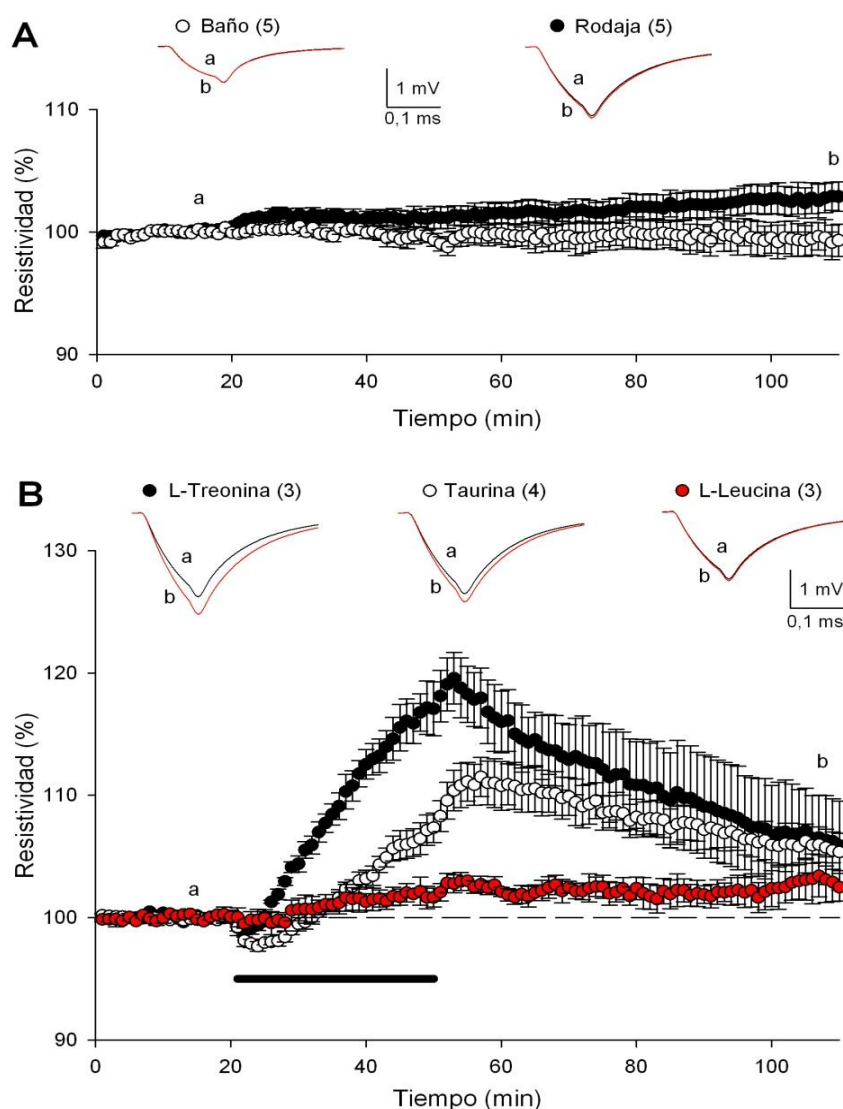


Fig. 4.16. **Incremento de la resistividad de la rodaja inducida por aminoácidos potenciadores.** En estos experimentos se emplean pulsos monofásicos de 100 μ s de duración a una intensidad que no produzca respuesta sináptica. **(A)** Los puntos blancos muestran cuando los electrodos se encuentran únicamente dentro de la solución KRB (Baño) y los círculos negros corresponden cuando se encuentran en la posición de trabajo dentro la rodaja (Rodaja), sobre la que solo se perfunde solución de KRB. **(B)** Los experimentos correspondientes a cada aminoácido vienen indicados por el color del círculo que se muestra al lado del nombre de cada aminoácido empleado. Para comprobar si había diferencias significativas se compararon para los experimentos de cada aminoácido la media de los últimos diez minutos de lavado frente la media de los 20 minutos de basal, mediante el t-test o el test de Mann-Whitney. Los trazados representativos del pulso monofásico aplicado en cada situación se presentan debajo del título correspondiente.

También se volvió a determinar con esta medida de la resistividad si se producía alguna diferencia al aplicar el aminoácido en un medio isosmótico respecto a un medio hiperosmótico. Estos experimentos se realizaron con taurina, al ser el aminoácido más estudiado, y como se puede apreciar en la Fig. 4.17 los cambios de resistividad producidos por la taurina en ambas circunstancias son indistinguibles.

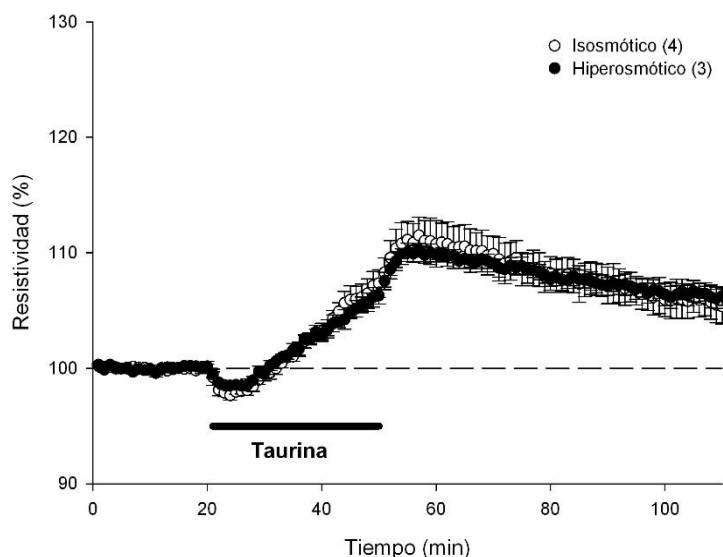


Fig. 4.17. **El incremento de la resistividad inducido por la taurina no se modifica en condiciones hiperosmóticas.** Los círculos blancos muestran los experimentos en los que se añadió taurina en un medio isosmótico ($295 \pm 0,2$ mOsm) y los círculos negros cuando se aplicó en un medio hiperosmótico ($327,1 \pm 0,6$ mOsm).

Estos experimentos demuestran que el curso temporal de las modificaciones de la resistividad de la rodaja provocados por diferentes aminoácidos son equiparables a las que estos aminoácidos causan sobre el fEPSP y el FV.

4.2.3. Efecto de los aminoácidos sobre el fEPSP, el FV y la resistividad en ausencia del anión cloruro del medio

La entrada de cloruro al interior celular es fundamental en los procesos de hinchamiento celular (Rothman, 1985; Choi, 1987). Con el fin de contrastar nuestra hipótesis de que los aminoácidos que inducen potenciación sináptica aumentan el volumen celular, realizamos una serie de experimentos en los que retiramos la mayor

parte de los aniones cloruro del medio de perfusión. En estos experimentos sustituimos equimolecularmente el cloruro sódico de la solución KRB por isetionato sódico, dado que el isetionato al no ser neuroactivo y no pasar al interior celular, evita en gran medida los procesos de hinchamiento (Rang y Ritchie, 1968; Rothman, 1985; Choi, 1987). Hay que resaltar que la retirada del cloruro también afecta a la actividad de varios transportadores como es el caso de la superfamilia de transportadores de neurotransmisores SLC6 que transporta GABA, glicina y taurina (Palacín et al., 1998; Bröer, 2002). Por lo tanto, además de impedir el hinchamiento celular también se restringiría la captación de algunos aminoácidos.

Los procesos inhibitorios en los que el cloruro es pieza fundamental son alterados negativamente por la retirada del anión cloruro. Para evitar que en ausencia de cloruro la mayor excitabilidad desemboque en descargas epilépticas espontáneas, se cortaron las fibras que comunican las neuronas piramidales de CA3 con las de la CA1 y se aumentó la concentración de magnesio en la solución KRB ya que este catión impide la activación de los receptores NMDA lo que evita las descargas epilépticas. Para que el incremento de magnesio no afectase a otras corrientes de calcio, se aumentó también la concentración de calcio (ver Materiales y métodos, apartado 3.5).

Se comparó una situación control, con la solución de alto calcio y magnesio y la CA3 cortada, frente a la misma situación con el isetionato sódico sustituyendo al cloruro sódico. Evaluamos en estas condiciones dos aminoácidos potenciadores pertenecientes a diferentes familias de transportadores, taurina y L-treonina (Fig. 4.18). Los cambios producidos en la concentración iónica y en la estructura de la rodaja en la situación control de estos experimentos no alteraron el perfil potenciador ni de taurina ni de L-treonina. Al utilizar el medio con isetionato y aplicar taurina 10 mM, el fEPSP permaneció disminuido mientras estuvo presente el aminoácido y recuperó los valores basales durante su lavado pero sin llegar a potenciar el fEPSP como en presencia de cloruro ($140,1 \pm 6,7\%$; $n = 4$ vs $108,7 \pm 5,3\%$; $n = 4$; en presencia y en ausencia de cloruro respectivamente; $p = 0,005$ t-test). La potenciación del FV inducida por la taurina también se redujo en isetionato ($124,4 \pm 3,8\%$; $n = 4$ vs $106,6 \pm 3,7\%$; $n = 4$; en presencia y en ausencia de cloruro respectivamente; $p = 0,008$ t-test). El aumento de resistividad también fue menor en isetionato ($106 \pm 1\%$; $n = 6$ vs $102,5 \pm 0,6\%$; $n = 4$; en presencia y en ausencia de cloruro respectivamente; $p = 0,022$; t-test). El efecto de la disminución de cloruro sobre los cambios producidos por la aplicación de L-

treonina 10 mM fue muy similar al obtenido con la aplicación de taurina. Se observó una gran disminución desde el inicio de la aplicación hasta el final del experimento para el fEPSP ($178,7 \pm 6,5\%$; $n = 5$ vs $121,4 \pm 1,4\%$; $n = 5$; en presencia y en ausencia de cloruro respectivamente; $p < 0,001$ t-test), para el FV ($161,5 \pm 3,6\%$; $n = 5$ vs $116,4 \pm 1,2\%$; $n = 5$; en presencia y en ausencia de cloruro respectivamente; $p < 0,001$ t-test) y para la resistividad ($107,8 \pm 1,9\%$, $n = 8$ vs $102,6 \pm 1,9\%$, $n = 5$; en presencia y en ausencia de cloruro respectivamente; $p = 0,036$ t-test).

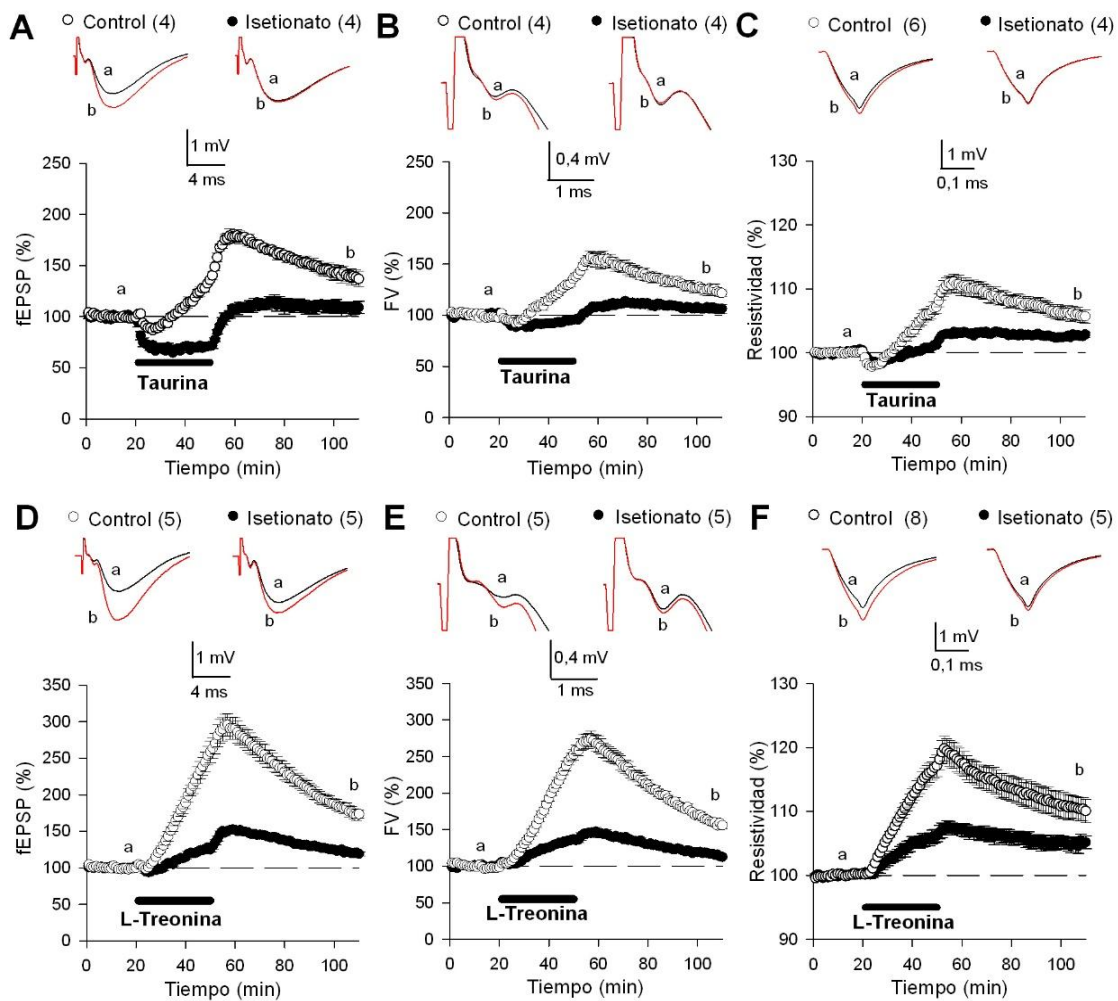


Fig. 4.18. Los efectos provocados por taurina y L-treonina requieren cloruro. Efecto de la perfusión de 10 mM de taurina (A, B, C) y de 10 mM de L-treonina (D, E, F) sobre el fEPSP (A, D), el FV (B, E) y la resistividad (C, F). Los círculos blancos corresponden a los experimentos en situación control con la solución KRB con alta concentración de calcio y magnesio, y la CA3 cortada. Los círculos negros muestran los experimentos en la misma condición que los controles más la sustitución del cloruro sódico por isetionato sódico. Los trazados de (B) y (E) son ampliaciones de los trazados mostrados en (A) y (D) respectivamente, para observar mejor los cambios en el FV.

La acumulación de taurina disminuyó claramente en isetionato ($35,4 \pm 3,3$ nmol/rodaja, $n = 4$ vs $12,9 \pm 2$ nmol/rodaja, $n = 4$; en presencia y en ausencia de cloruro, respectivamente; $p < 0,001$) (Fig. 4.19). La acumulación de L-treonina también sufrió una gran disminución ($23,7 \pm 3,6$ nmol/rodaja, $n = 5$ vs $8,19 \pm 1,41$ nmol/rodaja, $n = 5$; en presencia y en ausencia de L-treonina, respectivamente; $p = 0,002$).

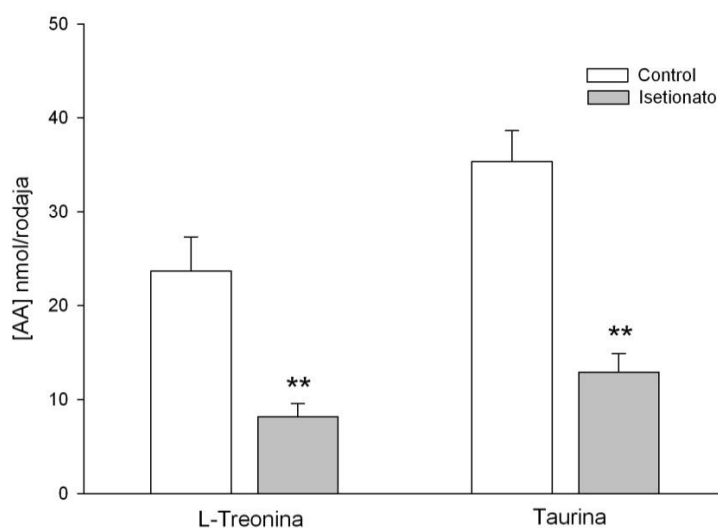


Fig. 4.19. **La acumulación de taurina y L-treonina depende de la concentración de cloruro.** Las barras representan la cantidad de L-treonina y taurina analizadas en las rodajas que fueron usadas en los experimentos de registro electrofisiológico mostrados en la Fig. 4.18. Se comparó la situación con NaCl frente a los experimentos con isetionato sódico utilizando el t-test o el test de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En este capítulo hemos comprobado que los procesos de potenciación sináptica inducidos por algunos aminoácidos, pese a no verse modificados por un medio hiperosmótico, están asociados a un aumento del volumen celular.

4.3. MEZCLAS DE AMINOÁCIDOS Y TRANSMISIÓN SINÁPTICA

Hasta ahora hemos comprobado que la aplicación individual de varios aminoácidos a una concentración (10 mM), que se aleja de la que se puede encontrar fisiológicamente en el espacio extracelular, potencia la transmisión sináptica por un mecanismo que parece requerir la acumulación intracelular del aminoácido. Cabe plantearse qué validez fisiológica podrían tener estas observaciones. Si consideramos que muchos de los aminoácidos que hemos utilizado comparten los mismos transportadores, se puede pensar que la aplicación conjunta de varios de ellos a sus concentraciones fisiológicas podría tener un efecto aditivo sobre la activación del transportador que se asemejase a la que hemos observado con altas concentraciones de un solo aminoácido. Por estas razones, decidimos estudiar cómo afectaba a la transmisión sináptica la aplicación de mezclas de aminoácidos en un rango fisiológico.

4.3.1. Mezcla de aminoácidos extracelulares

La primera mezcla que probamos fue una combinación de los principales aminoácidos presentes en el líquido extracelular del hipotálamo lateral de rata (Karnani et al., 2011), excluyendo a los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato. Esta mezcla, que denominamos “Extra” (ver composición en tabla 3.2), fue aplicada durante 90 minutos (Fig. 4.20). Esta mezcla produjo un ligero incremento del fEPSP que no llegó al 10% al final del experimento ($109,2 \pm 2,6\%$; $n = 5$; $p = 0,005$ t-test), mientras que sobre el FV apenas tuvo efecto ($102,8 \pm 1,4\%$; $n = 5$; $p = 0,055$ t-test), por lo que sí produjo una ligera ganancia en la eficacia sináptica ($5,7 \pm 2,5\%$ de reducción del cociente $FV/fEPSP$ $n = 5$; $p = 0,045$). La probabilidad de liberación no pareció verse afectada pues no se detectaron variaciones en el fenómeno de facilitación por pares de pulsos (Fig. 4.20C). Este perfil de actuación recuerda a lo visto por los aminoácidos en solitario pero con una magnitud mucho menor.

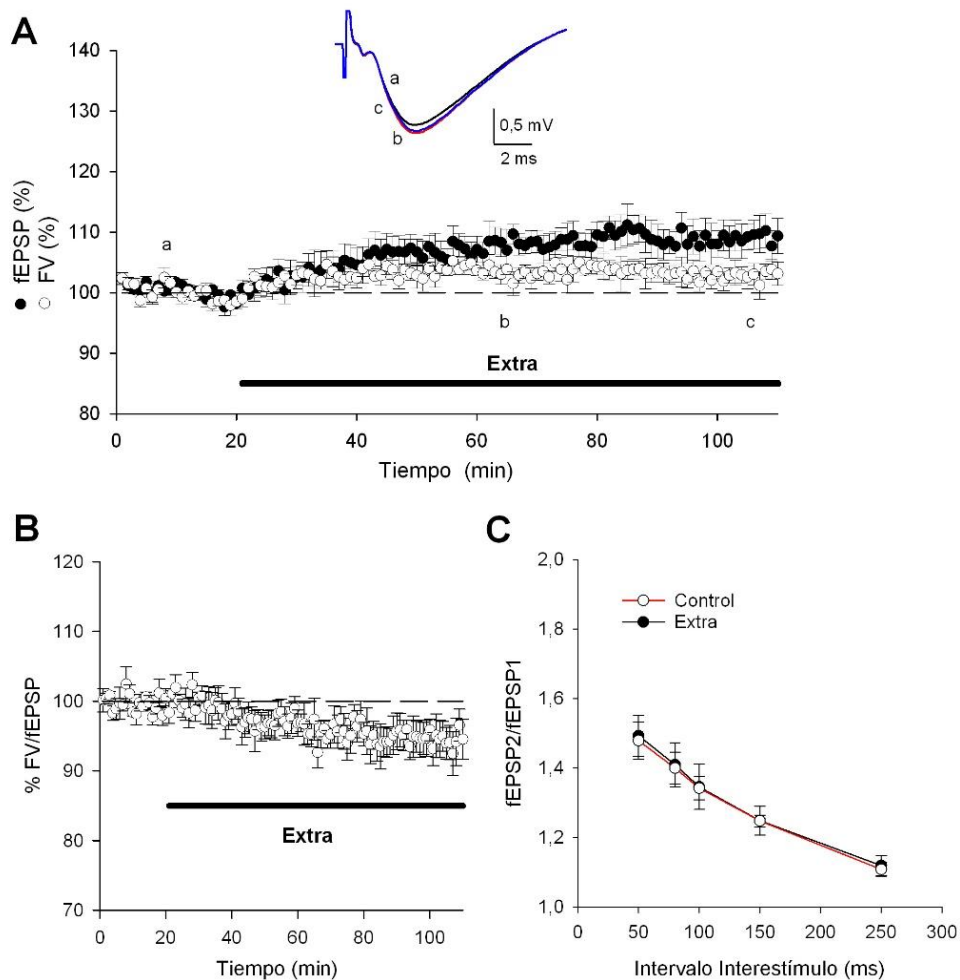


Fig. 4.20. **Efecto de la mezcla de aminoácidos extracelulares sobre la transmisión sináptica.** (A) Los círculos negros representan el curso temporal del fEPSP, mientras que los círculos blancos muestran el del FV ($n = 5$). (B) Curso temporal del cociente FV/fEPSP de los valores representados en A. (C) La situación control mostrada con círculos blancos fue realizada al menos 20 minutos antes de la aplicación de la mezcla de aminoácidos, mientras que la situación representada con círculos negros tuvo lugar en presencia de la mezcla Extra tras al menos 90 minutos de su aplicación ($n = 4$).

Estos experimentos ponen de manifiesto que las concentraciones extracelulares de los aminoácidos: L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-fenilalanina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-serina, taurina, L-tirosina, L-treonina, L-triptofano y L-valina; que en su totalidad suman 0,67 mM no parecen ser suficientes para provocar un efecto de potenciación como el provocado por los aminoácidos en solitario a concentraciones de 10 mM.

4.3.2. Mezcla de aminoácidos plasmáticos

En otro grupo de experimentos optamos por probar una combinación de aminoácidos similar a la que se encuentra en el plasma. Las cantidades de la mezcla de aminoácidos plasmáticos, que denominamos “Plasma” (ver composición en tabla 3.2) fueron obtenidas en su inmensa mayoría del trabajo de Nishimura et al. (1995), donde presentan el análisis de los aminoácidos del plasma de ratas Sprague-Dawley, con excepción de taurina que se obtuvo del trabajo de Lerma et al. (1986). En la solución de Plasma excluimos a los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato.

En estos experimentos perfundimos la mezcla de Plasma durante 105 minutos, tiempo suficiente para que el efecto de potenciación sobre el fEPSP llegara a un equilibrio y se mantuviera en él al menos durante 10 minutos (Fig. 4.21). Esta mezcla, que tiene una concentración total de 3,65 mM, sí provoca una gran potenciación tanto del fEPSP ($232,2 \pm 10,9\%$; $n = 7$) como del FV ($219,3 \pm 9,6 \%$).

El curso temporal de los cambios provocados por el Plasma en el fEPSP y el FV es superponible y solo hacia el final de la aplicación se hace patente el aumento de la eficacia sináptica (el cociente disminuye un $5,4 \pm 1,6\%$ respecto a la situación basal; $p = 0,003$; t-test).

La mezcla Plasmano afectó a la probabilidad de liberación estudiada con el protocolo de pares de pulsos (Fig. 4.21C).

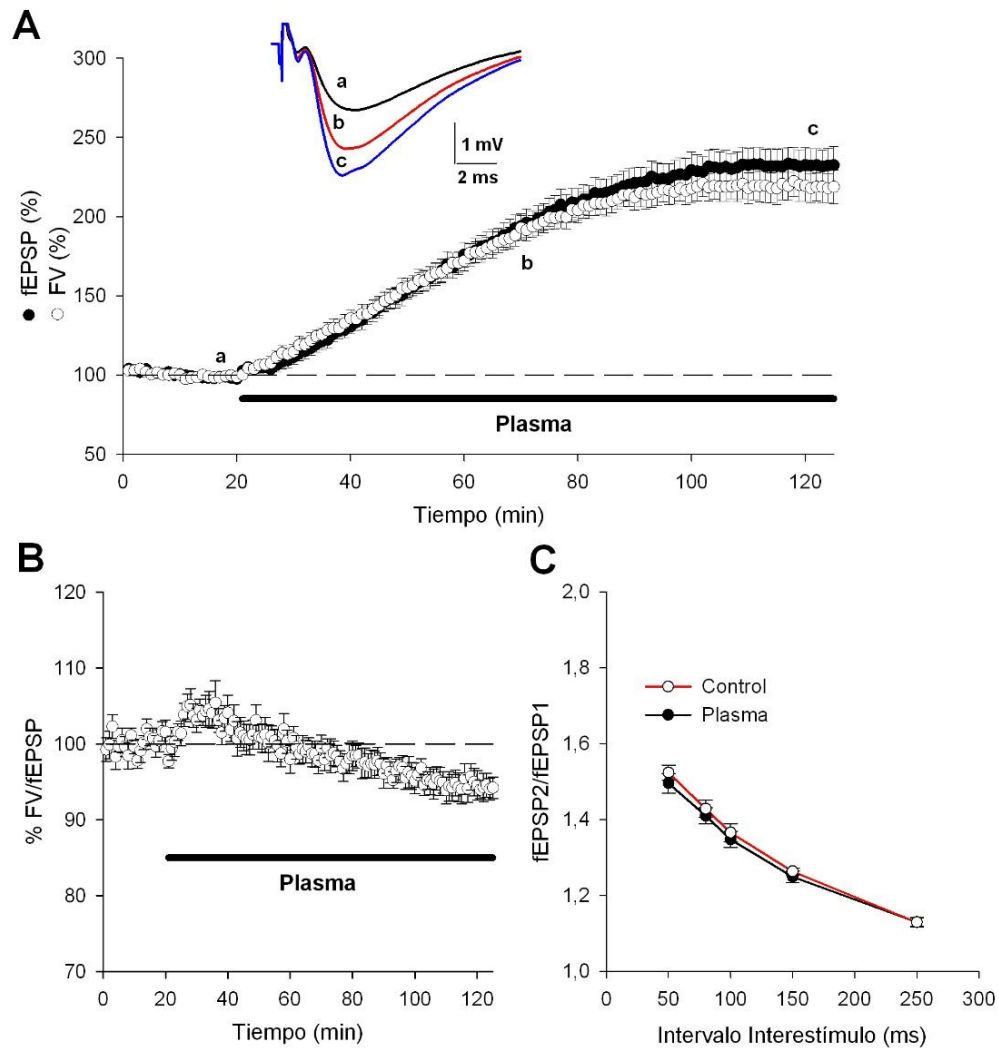


Fig. 4.21. **Efecto de la mezcla de aminoácidos plasmáticos sobre la transmisión sináptica.** (A) Curso temporal del fEPSP (círculos negros) y de la FV (círculos blancos) en presencia de la mezcla Plasma (barra horizontal negra). (B) Curso temporal de la eficacia sináptica mostrada como el cociente FV/fEPSP de los valores mostrados en A. (C) Comparación de la PPF en ausencia de la mezcla de aminoácidos (círculos blancos) y en presencia de la misma (círculos negros). Los experimentos mostrados en esta figura corresponden a la media de 7 experimentos.

Posteriormente comprobamos si el efecto de potenciación producido por la mezcla Plasma también involucraba un proceso de hinchamiento celular. Para ello realizamos una serie de experimentos en los que la mezcla Plasma se aplicó en una solución en la que sustituimos el cloruro sódico por isetionato sódico, de forma similar a la relatada en el apartado 4.2.3.

Con la retirada del anión cloruro se apreció una reducción en la potenciación del fEPSP que alcanzó un valor de $199,7 \pm 7,7\%$ al final de la aplicación en comparación con la potenciación del $289,4 \pm 12,7\%$ de la situación control ($p < 0,001$; t-test). La

potenciación del FV también se redujo de un $246 \pm 13,4\%$ ($n = 10$) en cloruro a un $177,5 \pm 8,5\%$ ($n = 9$) en isetionato ($p < 0,001$; t-test). La reducción de ambos parámetros (fEPSP y FV) fue muy similar al retirar el cloruro, por lo que no se apreciaron cambios en el curso temporal de la eficacia sináptica ($86,6 \pm 1,6\%$ y $88,9 \pm 2,9\%$ del cociente FV/fEPSP al final de la perfusión en presencia y ausencia de cloruro, respectivamente; $p = 0,455$). En estos experimentos se empleó otro sistema adicional para estimar si había habido un incremento en la eficacia sináptica. Se realizaron curvas estímulo-respuesta al menos 20 minutos antes de perfundir la mezcla Plasma y tras los 105 minutos de aplicación, todavía en presencia de la mezcla (ver Materiales y métodos, apartado 3.2.4). Los valores obtenidos en cada situación se ajustaban a la ecuación de una recta de la que se obtenía su pendiente, este parámetro fue el utilizado en la comparación. Incrementos en la pendiente nos indican un aumento de la eficacia sináptica. En ambas situaciones se apreciaron incrementos significativos de las pendientes, aumentando de $-3,8 \pm 0,2\%$ en situación basal a $-4,4 \pm 0,2\%$ al final del experimento cuando el cloruro estaba presente ($p < 0,001$ t-test pareado) y de $-2,8 \pm 0,3\%$ en situación basal a $-3,3 \pm 0,4\%$ al finalizar el lavado cuando el isetionato sódico fue utilizado ($p = 0,021$, t-test pareado). Este incremento coincide con lo observado en el curso temporal de la eficacia sináptica, aunque en este caso la situación control tuviera un crecimiento más acusado.

En estos experimentos no se pudo realizar el protocolo de pares de pulsos pues con un medio sin cloruro, pese a tener la CA3 cortada y alta concentración de magnesio, se producen descargas epilépticas con el segundo pulso del protocolo de estimulación.

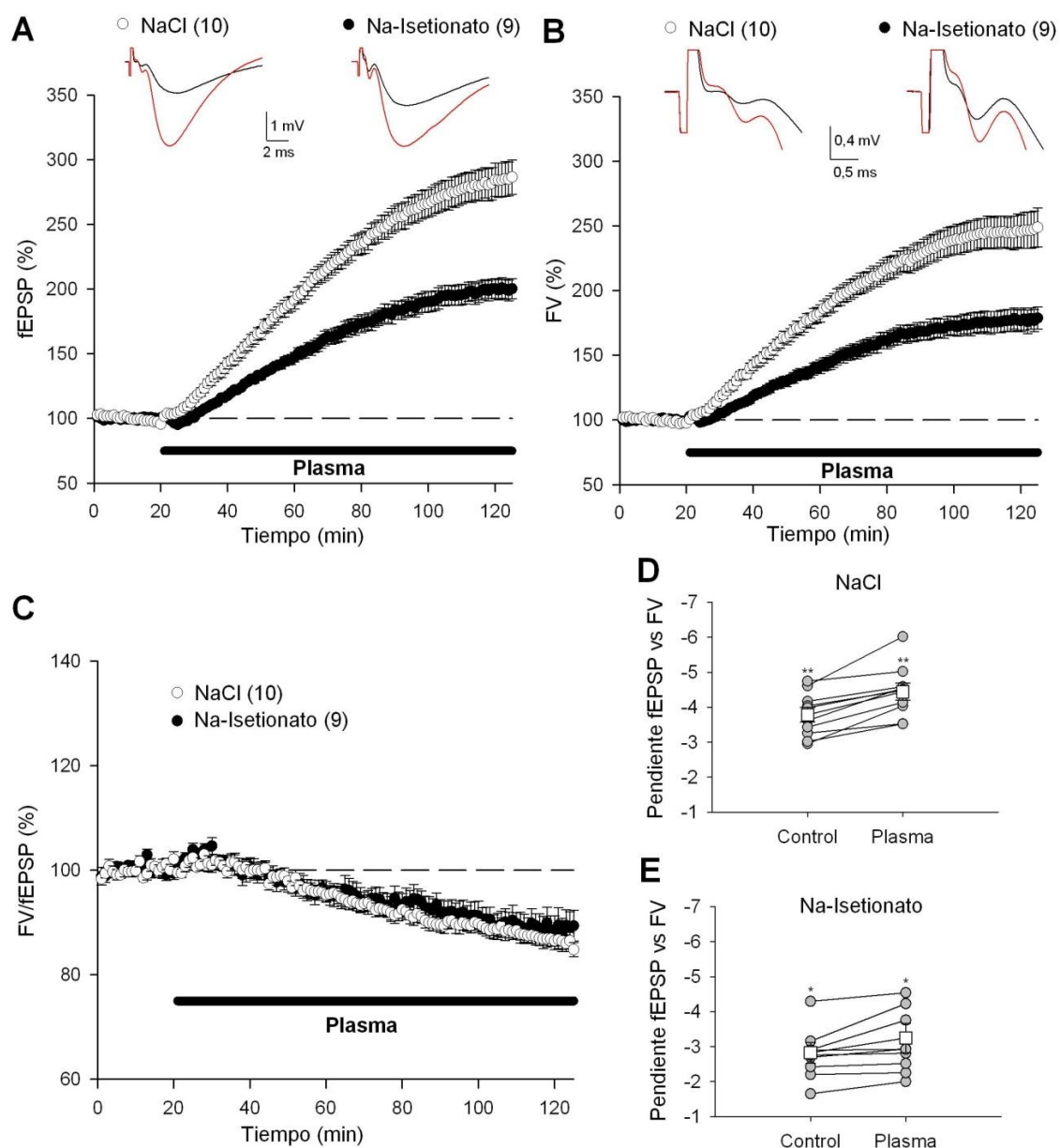


Fig. 4.22. **La potenciación producida por la solución Plasma se reduce en ausencia de cloruro.** Cursos temporales de los cambios inducidos por la mezcla de aminoácidos Plasma sobre el fEPSP (A), el FV (B) y para la eficacia sináptica (C), en presencia de cloruro sódico (círculos blancos) o de isetionato sódico (círculos negros). Los trazados representados en (B) son ampliaciones de los mismos trazados mostrados en (A) para observar mejor los cambios producidos en el FV. (D) y (E) Los puntos grises corresponden al valor de la pendiente de la curva estímulo-respuesta para cada experimento, realizada en situación control, al menos 20 minutos antes de la aplicación de la mezcla de aminoácidos y en la situación Plasma, en presencia de esta mezcla tras al menos su aplicación previa de 105 minutos. Los resultados de ambas situaciones para un mismo experimento vienen unidos por una línea continua, como sucede con las medias que están representadas por un cuadrado blanco con su EEM. Las diferencias Control vs Plasma se testaron con el t-test pareado; $p < 0,001$ en cloruro y $p = 0,021$ en isetionato.

En resumen, estos experimentos demuestran que la mezcla Plasma es capaz de mimetizar los efectos sobre la transmisión sináptica inducidos por la aplicación de altas concentraciones de un solo aminoácido, mediante un mecanismo que depende, al menos parcialmente, de la concentración extracelular del cloruro.

4.3.3. Comparación de las mezclas de aminoácidos plasmáticos potenciadores y no potenciadores

Habiendo demostrado el efecto de una mezcla de aminoácidos a concentraciones plasmáticas decidimos estudiar si todos sus componentes eran igualmente necesarios para potenciar la transmisión sináptica. Para ello dividimos los aminoácidos del Plasma en dos nuevas mezclas, una compuesta por los aminoácidos que en solitario potenciaban el fEPSP, a la que denominamos “Plasma1” (L-alanina, glicina, L-glutamina, L-histidina, L-serina, taurina y L-treonina); y otra mezcla que llamamos “Plasma2” (L-arginina, L-asparagina, L-cisteína, L-fenilalanina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-prolina, L-tirosina, L-triptófano y L-valina) en la que incluimos los aminoácidos que no potenciaban el fEPSP o bien no habían sido estudiados.

Al determinar el efecto de la mezcla Plasma1 observamos que provocaba cambios sobre los parámetros de transmisión sináptica similares a los producidos con la mezcla Plasma (Fig. 4.23). Desde el inicio de la perfusión de Plasma1 se produjo un aumento del fEPSP y del FV. Ambos parámetros incrementaron a un ritmo muy similar aunque el incremento del fEPSP al final del experimento fue algo mayor ($207,7 \pm 9,6\%$; $n = 5$) que el aumento del FV ($173,3 \pm 6,1\%$; $n = 5$), dando lugar a un aumento de la eficacia sináptica (una reducción del 16,1% del cociente FV/fEPSP, $p = 0,003$, t-test). Este aumento de la eficacia sináptica también lo comprobamos estudiando las curvas estímulo-respuesta en situación control y en presencia de Plasma1 (Fig. 4.23D). Con estas curvas también detectamos un incremento de la eficacia sináptica pues la pendiente con Plasma1 ($-5,6 \pm 0,5$) es significativamente mayor que la pendiente control ($-4,7 \pm 0,4$) ($p = 0,003$, t-test pareado). Por otra parte, la probabilidad de liberación de glutamato determinada por el protocolo de facilitación de pares de pulsos no se vio afectada por la perfusión de Plasma1 (Fig. 4.23F).

Esta mezcla Plasma1 se comparó con otra mezcla Plasma1 a la que se le añadieron los aminoácidos excitadores, glutamato (110 μ M) y aspartato (10 μ M). Estos dos aminoácidos, como el resto, se utilizaron a las concentraciones plasmáticas establecidas en Nishimura et al. (1995). La presencia de estos aminoácidos excitadores no supuso ningún cambio en los efectos provocados por el Plasma 1 sobre el fEPSP ($201,6 \pm 6,1\%$; $p = 0,554$; t-test), el FV ($166,5 \pm 5,7\%$; $p = 0,396$; t-test), o la eficacia sináptica (una reducción del 17,7% del cociente FV/fEPSP; $p = 0,662$; t-test).

En los experimentos en los que se aplicó la mezcla de aminoácidos Plasma2 se apreció un efecto mucho más discreto sobre los parámetros electrofisiológicos estudiados (Fig. 4.24). Plasma2 incrementó el fEPSP ($110,8 \pm 3,2\%$; $p = 0,005$; t-test) y el FV ($110 \pm 3\%$; $p = 0,004$; t-test) al final de la aplicación de la mezcla. En esta ocasión no varió la eficacia sináptica como se puede apreciar en el curso temporal del cociente FV/fEPSP ($p = 0,967$; t-test) (Fig. 4.24C) y en el estudio de las curvas estímulo-respuesta en ausencia y presencia de la mezcla Plasma2 (Fig. 4.24D). El estudio del fenómeno de la facilitación por pares de pulsos volvió a mostrar que no se producían cambios en la probabilidad de liberación por la aplicación de Plasma2.

Al añadir los aminoácidos excitadores glutamato (110 μ M) y aspartato (10 μ M) a la mezcla Plasma2, el efecto producido sobre el fEPSP ($118,8 \pm 5,6\%$; $p = 0,085$; t-test), el FV ($117,2 \pm 2,9\%$; $p = 0,053$; t-test), y la eficacia sináptica ($p = 0,777$; t-test) fue similar al producido con Plasma2 sin esos dos aminoácidos.

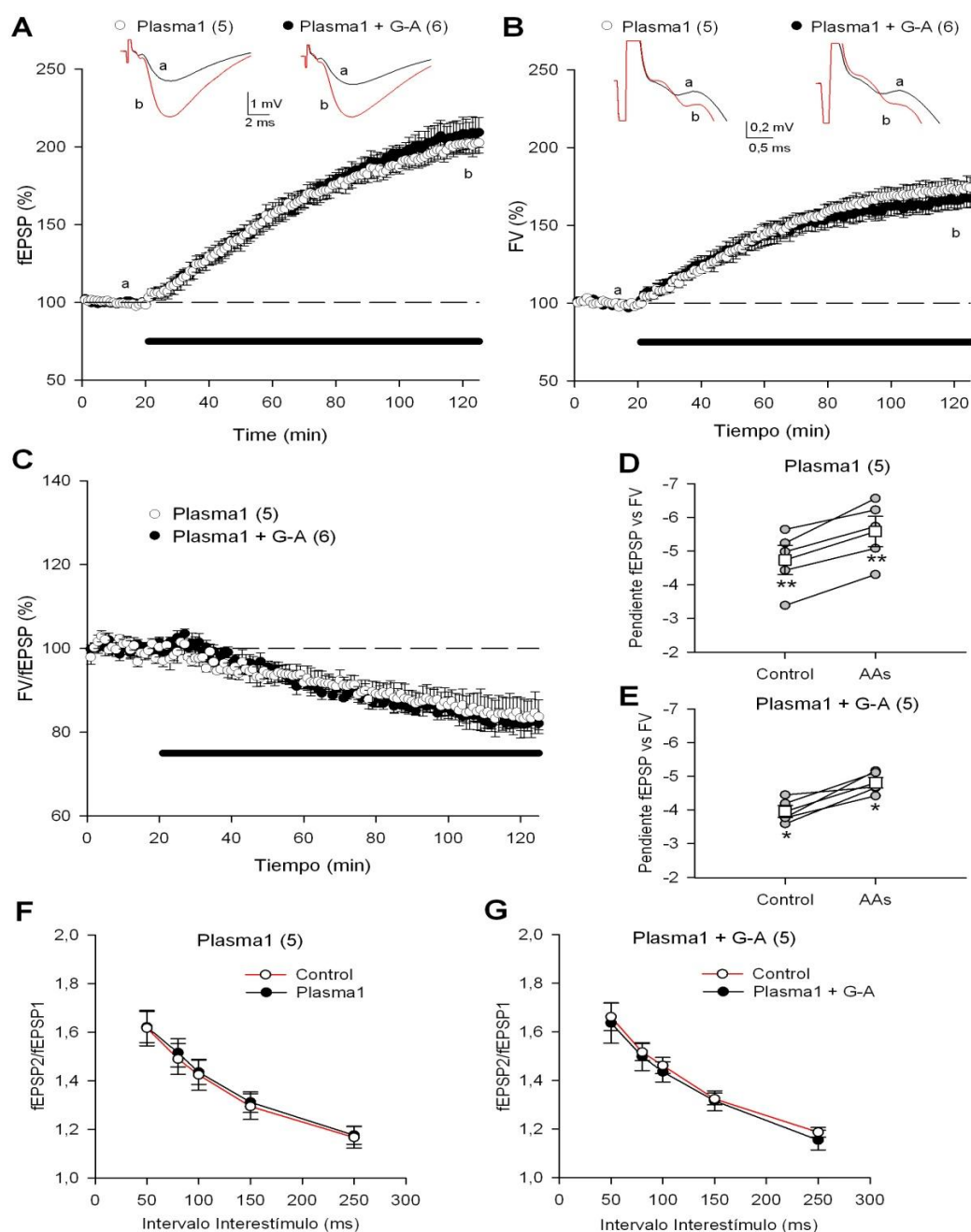


Fig. 4.23. Efectos sobre la transmisión sináptica producidos por la mezcla de aminoácidos Plasma1. Cursos temporales de los cambios inducidos por la mezcla de aminoácidos Plasma1 (círculos blancos) o la mezcla Plasma1 con glutamato 110 μ M y aspartato 10 μ M (círculos negros) sobre el fEPSP (**A**), el FV (**B**) y para el cociente FV/fEPSP como eficacia sináptica (**C**). Los trazados representados en el gráfico (**B**) son ampliaciones de los mismos trazados mostrados en (**A**), para observar mejor los cambios producidos en el FV. (**D**) y (**E**) Los puntos grises representan el valor de la pendiente de la curva estímulo-respuesta para cada experimento individual en ausencia (control) y presencia (AAs) de las mezclas aplicadas. Para estudiar las diferencias en estos experimentos se realizó el t-test pareado, $p = 0,003$ en Plasma1 y $p = 0,045$ en Plasma1 + G-A. (**F**) y (**G**) Los círculos blancos hacen referencia a los pares de pulsos aplicados en ausencia de cualquier mezcla y los puntos negros en presencia de la mezcla de aminoácidos correspondiente.

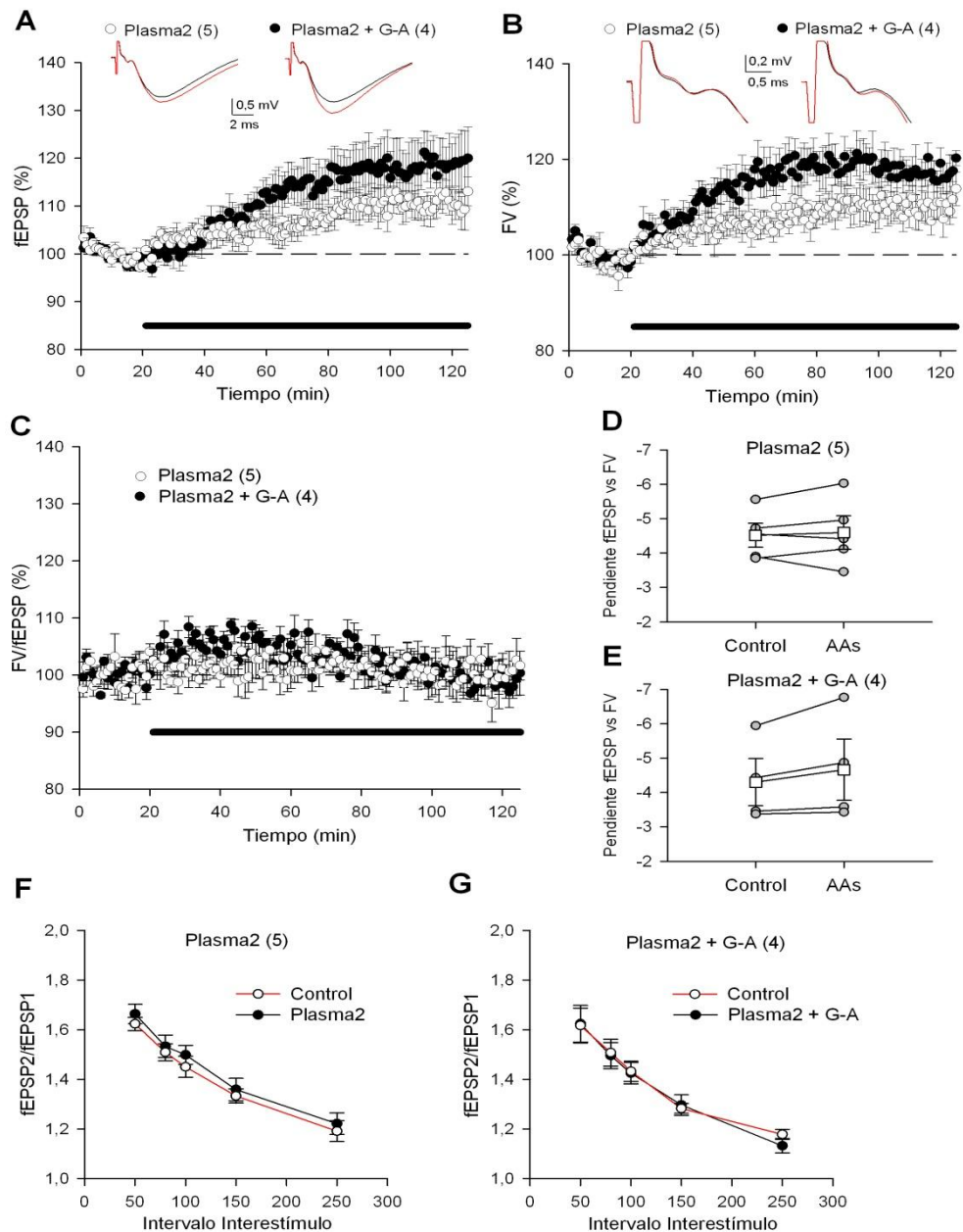


Fig. 4.24. Efectos sobre la transmisión sináptica producidos por la mezcla de aminoácidos Plasma2. Cursos temporales de los cambios inducidos por la mezcla de aminoácidos Plasma2(círculos blancos) o la mezcla Plasma2 con glutamato 110 μ M y aspartato 10 μ M(círculos negros) sobre el fEPSP (A), el FV (B) y para el cociente FV/fEPSP como eficacia sináptica (C). Los trazados representados en el gráfico (B) son ampliaciones de los mismos trazados mostrados en (A), para observar mejor los cambios producidos en el FV. (D) y (E) Los puntos grises representan el valor de la pendiente de la curva estímulo-respuesta para cada experimento individual en ausencia (control) y presencia (AAs) de las mezclas aplicadas. Para estudiar las diferencias en estos experimentos se realizó el t-test pareado, $p = 0,651$ en Plasma2 y $p = 0,130$ en Plasma2 + G-A. (F) y (G) Los círculos blancos hacen referencia a los pares de pulsos aplicados en ausencia de cualquier mezcla y los puntos negros en presencia de la mezcla de aminoácidos correspondiente.

En resumen, en este apartado hemos comprobado que la potenciación del fEPSP y del FV provocada por la aplicación de aminoácidos en solitario a concentraciones de 10 mM es reproducida por la aplicación continuada de mezclas de aminoácidos a las concentraciones que se encontrarían en el plasma de rata. Este efecto es en parte dependiente de la presencia del cloruro en el medio, por lo que los fenómenos de hinchamiento celular parecen estar involucrados en su inducción. Es destacable que los aminoácidos que denominados potenciadores, agrupados a sus concentraciones plasmáticas en la mezcla Plasma1, provoquen potenciaciones similares a las inducidas por la mezcla Plasma, mientras que la mezcla de los no potenciadores (Plasma2) produzca solo un pequeño incremento del fEPSP y del FV.

4.4. EFECTO DE LAS MEZCLAS DE AMINOÁCIDOS EN PROCESOS DE HIPOXIA

Hemos visto que la mezcla de aminoácidos a sus concentraciones plasmáticas es capaz de provocar la potenciación de la transmisión sináptica, pero en condiciones fisiológicas las neuronas no entran en contacto con el plasma. Estas concentraciones se pueden alcanzar, por ejemplo, durante eventos patológicos que lleven aparejado una extravasación del plasma al medio extracelular como sucede en las lesiones isquémicas o de traumatismo cerebral (Westergren et al., 1994; Koizumi et al., 1997; Østergaard et al., 2013).

En este capítulo se presentan los experimentos en los que se valoró si la presencia de una mezcla de aminoácidos a concentraciones plasmáticas favorecía el deterioro causado por las condiciones de hipoxia que ocurren durante los episodios isquémicos.

4.4.1. Hipoxia y mezcla Plasma

En un primer grupo de experimentos, las rodajas se sometieron a un periodo de hipoxia (sustituyendo el O₂ por N₂) en presencia de glutamato y aspartato a sus concentraciones plasmáticas, ya que estos aminoácidos excitadores parecen ser

esenciales para desencadenar la excitotoxicidad asociada a los procesos isquémicos (Simon et al., 1984; Rothman, 1984; Rothman y Olney, 1986). En estos experimentos se observó que la hipoxia en presencia de glutamato y aspartato provocaba rápidamente la desaparición del fEPSP, mientras que producía una leve disminución transitoria del FV ($17,6 \pm 2,1\%$ durante los 10 primeros minutos) que se recuperaba paulatinamente hasta alcanzar valores basales hacia el final del periodo de hipoxia (Fig. 4.25, círculos blancos). Una vez reintroducida la oxigenación y retirados el glutamato y el aspartato del medio de perfusión, se observó la rápida recuperación del fEPSP mientras el FV se mantenía inalterado. Sin embargo, cuando la hipoxia se acompañó de los aminoácidos de la mezcla Plasma más el glutamato y el aspartato, el fEPSP quedó totalmente deprimido durante los 40 min de lavado en la mayoría de experimentos (4 de 5). En estas circunstancias, el comportamiento del FV fue totalmente diferente, aumentó paulatinamente alcanzando un valor máximo de $450,2 \pm 67,1\%$ hacia el final del periodo de hipoxia, y permaneció potenciado durante la reoxigenación y el lavado del Plasma ($264,5 \pm 30\%$). Curiosamente, en otro grupo de rodajas se constató que estos cambios sobre el fEPSP y el FV también se provocaban cuando la hipoxia se acompañaba solo de la mezcla Plasma sin que fuese necesaria la aplicación exógena de los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato (Fig. 4.25, círculos rojos). De ahora en adelante, a menos que se especifique lo contrario los valores medios mostrados corresponderán a intervalos de 5 minutos.

Estos experimentos indican que durante la hipoxia es más deletérea la presencia de los aminoácidos del Plasma sin glutamato y aspartato que la de estos aminoácidos excitadores solos.

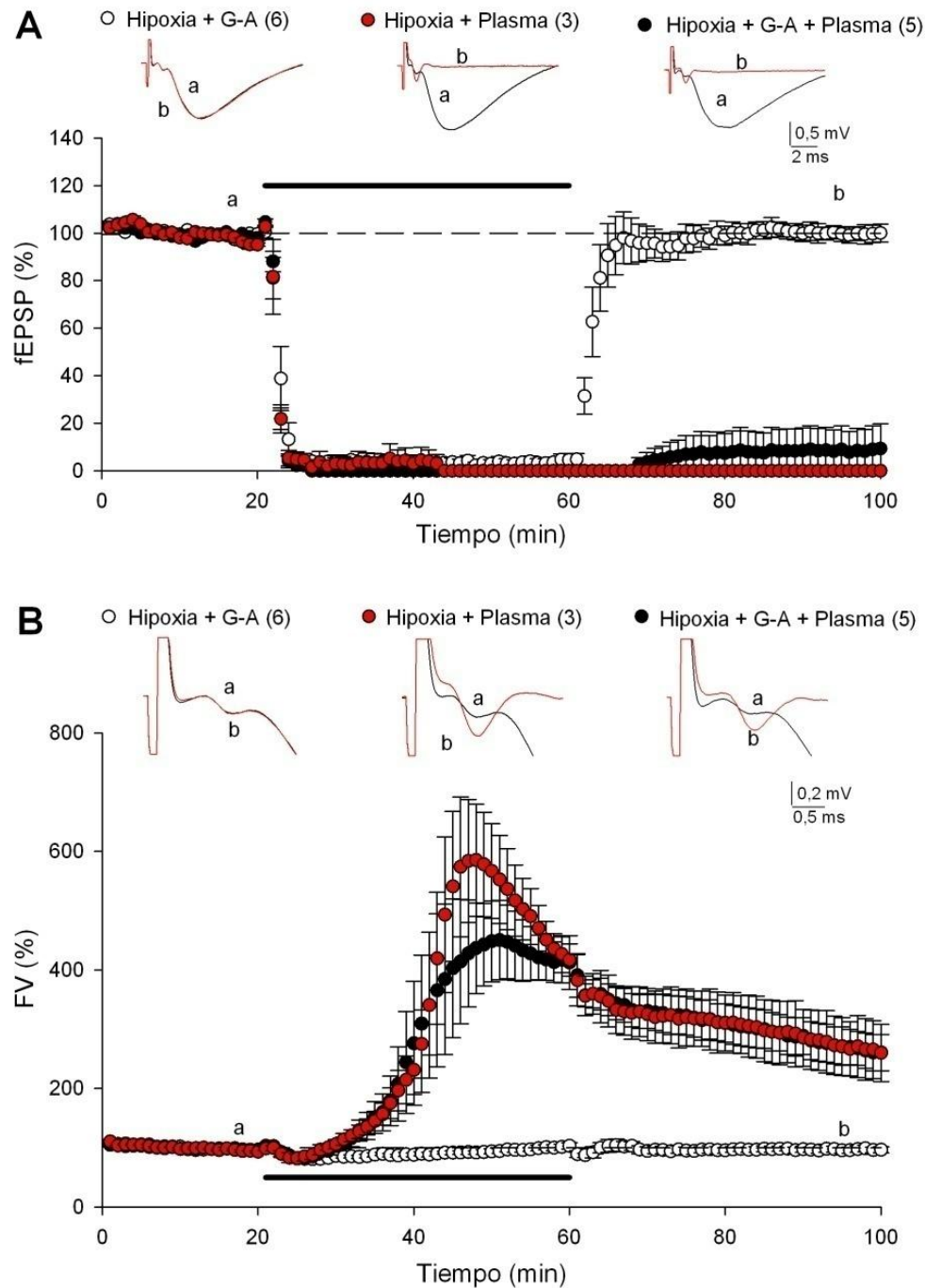


Fig. 4.25. **La mezcla Plasma impide la recuperación del fEPSP tras un periodo de hipoxia.** Curso temporal de los cambios en el fEPSP (A) y FV (B) causados por un periodo de hipoxia con los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato (G-A) (círculos blancos), con la mezcla Plasma (círculos rojos), o con G-A y Plasma (círculos negros). La barra horizontal indica el periodo de aplicación de los aminoácidos y el proceso hipóxico. Los trazados mostrados en (B) son ampliaciones de los mostrados en (A).

4.4.2. Hipoxia y mezcla Plasma1

En este apartado se desarrollaron una serie de experimentos para comprobar si los aminoácidos potenciadores incluidos en Plasma1 también facilitaban las alteraciones sinápticas provocadas por la hipoxia.

En primer lugar se probó esta mezcla durante 40 minutos en ausencia de oxígeno y se observó un comportamiento muy similar al encontrado con la mezcla Plasma. Plasma1 redujo irreversiblemente el fEPSP ($21,1 \pm 10,8\%$ de los valores iniciales al final del experimento) y provocó un gran aumento de la amplitud del FV ($498,2 \pm 50,2\%$ al final del periodo de hipoxia y $184,9 \pm 19,8\%$ al final del lavado). En 9 de los 14 experimentos realizados en estas condiciones, el fEPSP no tuvo ninguna recuperación durante el periodo de lavado (Fig. 4.26, parte superior). Por tanto la presencia de los componentes de la mezcla Plasma2 no era necesaria para la aparición del efecto lesivo sobre la transmisión sináptica. Esto nos llevó a plantearnos si este efecto nocivo de Plasma1 en hipoxia estaría mediado específicamente por alguno de sus componentes.

Para esclarecer este punto se utilizaron distintas mezclas de aminoácidos elaboradas con parte de los componentes de la mezcla Plasma1. Las primeras mezclas que se probaron fueron “Plasma1.1” que contenía los aminoácidos capaces de activar al receptor NMDA a concentraciones de milimolar (L-alanina, glicina y L-serina), y “Plasma1.2” donde se incluyeron el resto de aminoácidos (L-glutamina, L-histidina, taurina y L-treonina). El fEPSP se recuperó rápidamente con ambas mezclas, quedando ligeramente potenciado con la mezcla Plasma 1.1 ($120,9 \pm 6,5\%$; $n = 4$; $p = 0,012$; t-test) y ligeramente reducido con la mezcla Plasma 1.2 ($96,1 \pm 1,7\%$; $n = 5$; $p = 0,030$; t-test). Con ambas soluciones, el FV terminó con valores muy cercanos a los basales ($117,3 \pm 4\%$; $p = 0,003$ y $99,5 \pm 3,1\%$; $p = 0,863$, respectivamente).

Con la mezcla “Plasma1.3” (glicina, L-glutamina, L-histidina, taurina y L-treonina), el fEPSP también se recuperó durante los 40 minutos de lavado ($105,6 \pm 13,3\%$; $n = 6$), mientras que la potenciación del FV durante la hipoxia solo alcanzó un $143,5 \pm 12\%$ de los valores basales, y no se mantuvo durante el lavado ($105,4 \pm 7,2\%$ al final del lavado). Por otra parte, la mezcla “Plasma1.4”, a la que únicamente le faltaba L-serina para ser Plasma1, mantuvo deprimido el fEPSP tras la hipoxia ($40,1 \pm 22,1\%$ al

final del periodo de lavado) y potenció el FV hasta un $363,8 \pm 69,3\%$ durante su aplicación. Esta potenciación del FV decayó a un valor de $112,6 \pm 16,3\%$ al final del lavado.

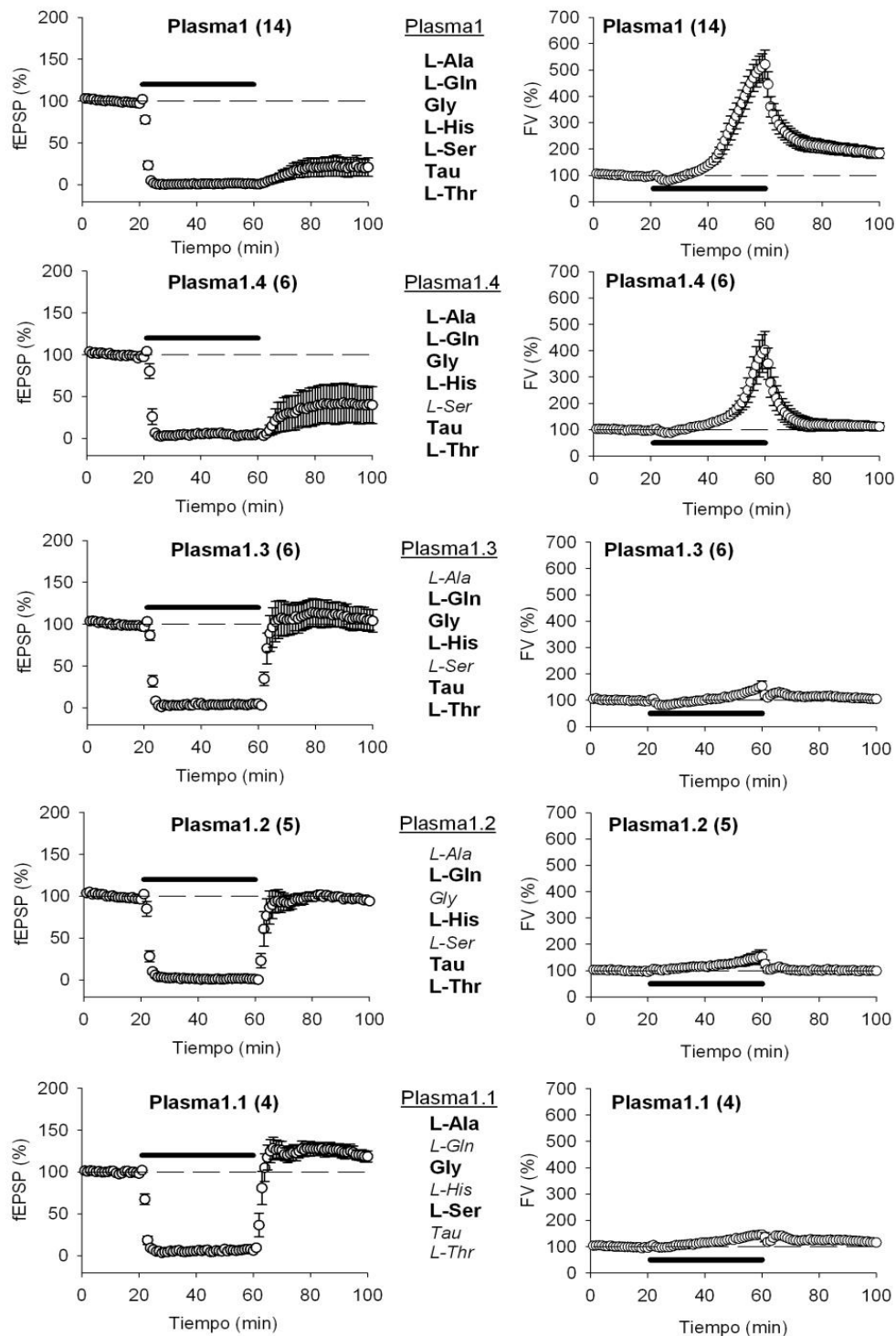


Fig. 4.26. Determinación de los aminoácidos del Plasma1 necesarios para provocar el efecto deletéreo de la hipoxia sobre el fEPSP. Cursos temporales para los cambios del fEPSP a la izquierda y para el FV a

la derecha. Los aminoácidos que componen cada mezcla vienen señalados en **negrita** en la lista, mientras que en *cursiva* se muestran los aminoácidos que faltarían para formar la mezcla Plasma1.

Con estos experimentos se comprueba que es muy poco probable que el efecto sobre el fEPSP durante la hipoxia sea debido a la acción directa de los aminoácidos del Plasma sobre los receptores NMDA, ya que los aminoácidos con capacidad para activar a estos receptores no causaron la depresión mantenida del fEPSP. Además, queda patente la relevancia de la cantidad de aminoácidos que componen la mezcla de Plasma1 para obtener el efecto depresor sobre el fEPSP.

En los procesos hipóxicos el tiempo es un factor clave en la recuperación del tejido. Por lo tanto, para determinar si la duración de la hipoxia en presencia de Plasma1 es importante en la depresión irreversible del fEPSP, realizamos otros experimentos en los que las rodajas estuvieron sometidas a 30 min de hipoxia (Fig. 4.27B). En esta situación, el fEPSP recuperó hasta un $81,3 \pm 13,7\%$ de su valor basal ($p = 0,001$; comparado con el grado de recuperación obtenido con 40 min de hipoxia). En 2 de 13 experimentos, la recuperación del fEPSP fue inferior al 10%. El FV aumentó un $203,5 \pm 23,9\%$ durante la hipoxia, lo que fue significativamente menor que el conseguido con 40 min de hipoxia ($p < 0,001$; t-test). Tras los 40 minutos de reoxigenación el FV volvió a sus valores basales.

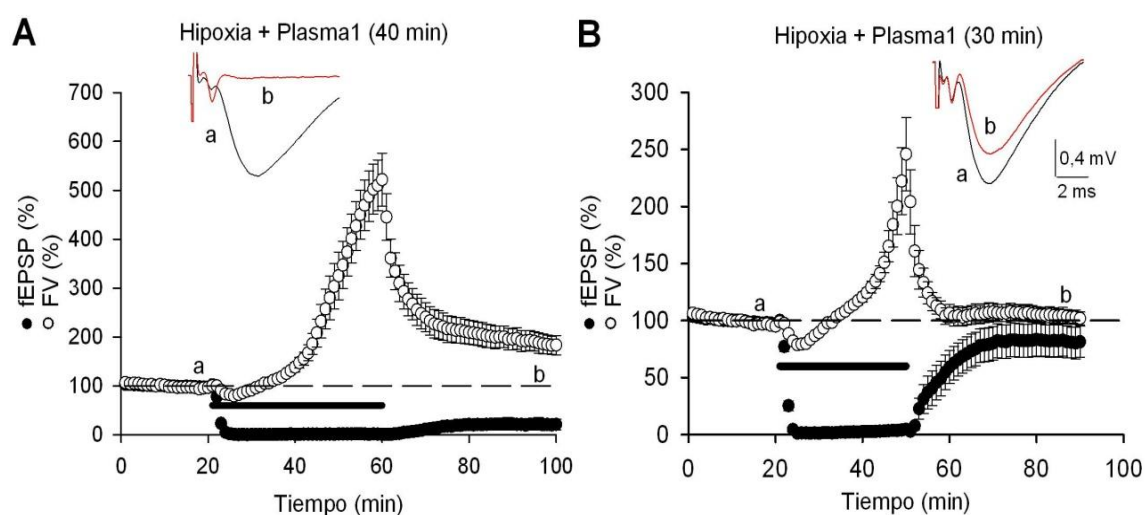


Fig. 4.27. **Importancia del tiempo de aplicación de la hipoxia y el Plasma1 sobre la posterior recuperación de la transmisión sináptica.** Cursos temporales de los cambios en el fEPSP (círculos negros) y FV (círculos blancos) ocasionados por un periodo de hipoxia y aplicación de Plasma1 durante 40 min en 14 rodajas (A) ó 30 min en 13 rodajas (B).

Con estos experimentos demostramos que el tiempo de exposición a la hipoxia y Plasma1 es un factor clave en el efecto deletéreo sobre la transmisión sináptica.

Dado que los receptores NMDA son una pieza fundamental en la excitotoxicidad producida por glutamato en los procesos de hipoxia e isquemia (Simon et al., 1984; Choi, 1987; Lau y Tymianski, 2010), en el siguiente grupo de experimentos se comprobó si los receptores NMDA participaban en la depresión irreversible del fEPSP causada por la hipoxia y el Plasma1. Estos experimentos se hicieron en la continua presencia de AP5, un antagonista NMDA. En estas circunstancias, tras el periodo de hipoxia y el Plasma1, el fEPSP se recuperó rápidamente e incluso quedó potenciado por encima de sus valores basales ($148,2 \pm 6\%$, $n = 5$; $p < 0,001$; t-test) (Fig. 4.28A). También el patrón de cambios en el FV fue diferente en presencia de AP5, llegando a alcanzar durante los últimos 5 minutos de hipoxia una potenciación del $187,3 \pm 20,6 \%$, un valor muy inferior al observado en ausencia de AP5 ($p = 0,002$; t-test). Sin embargo, estas diferencias en la magnitud de la potenciación del FV no se mantuvieron al final del periodo de lavado ($160,5 \pm 14\%$; $p = 0,473$; t-test) (Fig. 4.28C).

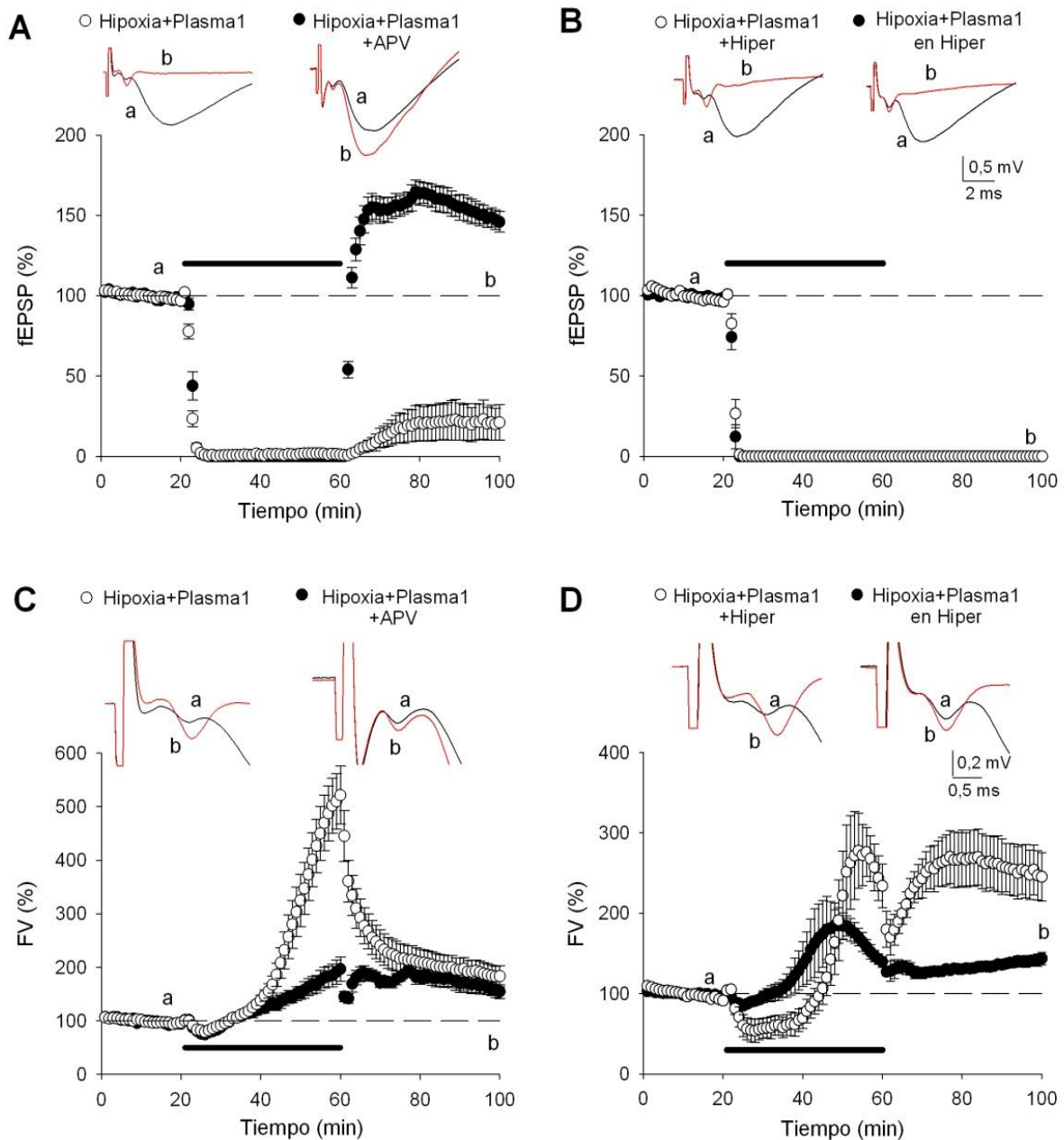


Fig. 4.28. **Unantagonista NMDA, el AP5, revierte la depresión irreversible del fEPSP producida por un periodo de hipoxia y Plasma1, mientras que un medio hiperosmótico no lo afecta.** Cursos temporales para los cambios del fEPSP (A) y (B) y para el FV (C) y (D). En (A) y (C) los círculos blancos y negros representan los experimentos en ausencia ($n = 14$) y presencia de AP5 $100 \mu\text{M}$ ($n = 5$), respectivamente. En (B) y (D) los círculos blancos representan los experimentos en los que se aplicaba la hipoxia y Plasma1 junto a sacarosa 30 mM ($n = 4$) y los círculos negros representan los experimentos en los que la hipoxia y Plasma1 se aplicó en la continua presencia de un medio hiperosmótico hecho con sacarosa 30 mM ($n = 3$). Los trazados de (C) y (D) son ampliaciones de los representados en (A) y (B) respectivamente, para una mejor apreciación de los cambios del FV.

También determinamos si aumentando la osmolaridad del medio se podía impedir el efecto deletéreo sobre la transmisión sináptica causado por la aplicación de hipoxia y Plasma1. Usamos dos abordajes, aplicar el medio hiperosmótico (añadiendo sacarosa 30 mM) solo durante el periodo de hipoxia y Plasma1, o mantener el medio hiperosmótico durante todo el experimento. Al introducir el medio hiperosmótico solo durante la hipoxia queríamos comprobar si este abordaje daría diferentes resultados que los conseguidos si el medio hiperosmótico estuviese ya presente, en cuyo caso se habría alcanzado un equilibrio osmótico. Como se puede apreciar en la Fig. 4.28B, con ninguno de los dos abordajes el medio hiperosmótico sirvió para favorecer la recuperación del fEPSP y este quedó totalmente deprimido

El curso temporal del FV sí mostró diferencias con el medio hiperosmótico frente al efecto observado en medio isosmótico (Fig. 4.28D). Cuando el medio hiperosmótico se añadió junto a la hipoxia y el Plasma1, el FV disminuyó hasta un $55,4 \pm 13,5\%$ (media de los 6 a 10 primeros minutos de aplicación) pero se fue recuperando hasta acabar en $255,9 \pm 27,2\%$ al finalizar la aplicación. La potenciación del FV durante el proceso de hipoxia fue aún menor cuando el medio hiperosmótico estuvo siempre presente, llegando a un valor de $148 \pm 7,4\%$ al final de la aplicación. La diferencia entre estas dos situaciones se mantuvo durante el lavado donde el FV del medio hiperosmótico aplicado solo durante la hipoxia quedó en unos valores de $249,5 \pm 31,2\%$ frente a la potenciación de $141,5 \pm 7,2\%$ del medio hiperosmótico presente todo el experimento ($p = 0,020$; t-test). Los valores de potenciación del FV durante la hipoxia se alejan de los que se alcanzan en medio isosmótico (Fig. 4.28C, círculos blancos) aunque estas diferencias no se mantienen al final del periodo de lavado ($p = 0,115$ y $p = 0,320$; comparaciones del final del periodo de lavado en medio isosmótico frente a las del medio hiperosmótico presente solo durante la hipoxia o durante todo el experimento, respectivamente).

Habiendo probado la implicación de los receptores NMDA en este proceso, en otro grupo de rodajas estudiamos si los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato podían hacer que la aplicación de hipoxia y Plasma1 durante 30 min tuviese el efecto deletéreo sobre fEPSP (Fig. 4.29).

El efecto de añadir glutamato ($110 \mu\text{M}$) y aspartato ($10 \mu\text{M}$) durante la aplicación de hipoxia y Plasma1 fue bastante notable sobre el fEPSP, recuperando solo

un $14,2 \pm 7,3 \%$ ($n = 10$) al final del lavado (Fig. 4.29A). Este valor es muy inferior al obtenido cuando se provoca la hipoxia en Plasma1 sin aminoácidos excitadores ($p < 0,001$; t-test). Este efecto deletereo también quedó patente al contabilizar la tasa de recuperación. Al añadir los aminoácidos excitadores ninguno de los experimentos realizados recuperó el fEPSP por encima del 80% y hasta un 72,7% quedó por debajo del 20% de recuperación, mientras en ausencia de glutamato y aspartato el 53,8% de los experimentos recuperó más de un 80% del fEPSP y solo un 15,4 % quedó por debajo del 20% de recuperación (Fig. 4.29B).

El FV mostró diferencias con la adición de glutamato y aspartato, sobre todo durante el periodo de hipoxia, durante el cual los aminoácidos excitadores provocaron una potenciación del $386,8 \pm 53,1\%$ ($n = 9$) muy por encima del valor obtenido en ausencia de los aminoácidos excitadores ($p = 0,002$; t-test). Se excluyó de este valor medio un experimento en el que el FV llegó a desaparecer por completo. Sin embargo, los valores del FV al final del lavado no mostraron diferencias en ausencia o presencia de los aminoácidos excitadores ($122,9 \pm 22\%$; $p = 0,322$; t-test).

Estos resultados indican que si durante un periodo de hipoxia están presentes los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato conjuntamente con otros aminoácidos no excitadores, todos ellos a sus concentraciones plasmáticas, se puede exacerbar un efecto deletéreo sobre la transmisión sináptica.

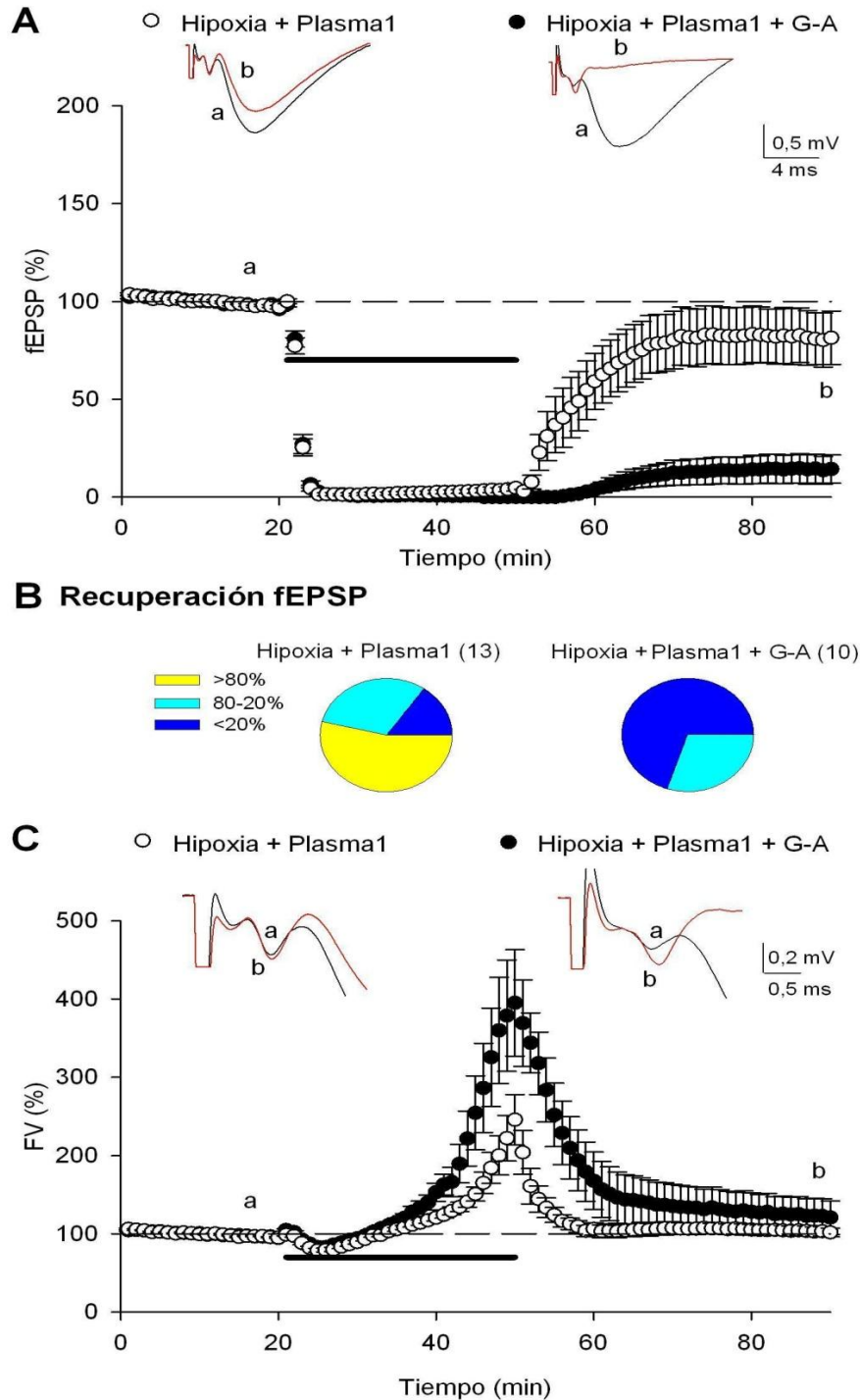


Fig. 4.29. Los aminoácidos excitadores exacerban el efecto deletéreo de la hipoxia y el Plasma1 sobre el fEPSP. Los cursos temporales del fEPSP (A) para los experimentos en los que se aplicó hipoxia en Plasma 1 (círculos blancos, $n = 13$) y para los experimentos en los que además se añadió glutamato y aspartato (G-A) (círculos negros, $n = 11$), y del FV (C). Los trazados mostrados en (C) son ampliaciones de los trazados de (A). En (B) Se muestran en gráficos circulares el porcentaje de experimentos que al final del lavadorecuperaron el fEPSP<20% (en azul oscuro), entre 20 y 80% (en azul celeste) y >80% (en amarillo). Los valores para estos gráficos fueron obtenidos de la media de los últimos 5 minutos de lavado.

4.4.3. Cambios histológicos producidos tras la depresión duradera del fEPSP después de un periodo de hipoxia

Habiendo comprobado que la mezcla Plasma y la mezcla Plasma1 son capaces de impedir la recuperación del fEPSP que se produce tras un periodo de hipoxia, quisimos averiguar si este efecto electrofisiológico tenía un correlato morfológico. Los resultados que se muestran a continuación corresponden a lo observado en una rodaja tratada con la mezcla Plasma1 en ausencia de oxígeno en la que no se observó recuperación del fEPSP tras los 45 minutos de lavado. Esta se comparó con dos rodajas control obtenidas del mismo animal que tuvieron el mismo tratamiento que la rodaja problema salvo por la exposición a los aminoácidos y el periodo de hipoxia.

Con las técnicas inmunohistoquímicas empleadas pudimos observar una clara disminución en la expresión de β -tubulina isotipo 3 en las dendritas y los somas de neuronas piramidales de la región CA1 (Fig. 4.30B) respecto a las neuronas de la misma región en rodajas control (Fig. 4.30A). La pérdida de este elemento clave en la formación del citoesqueleto y el transporte neuronal conllevaría una grave alteración dendrítica.

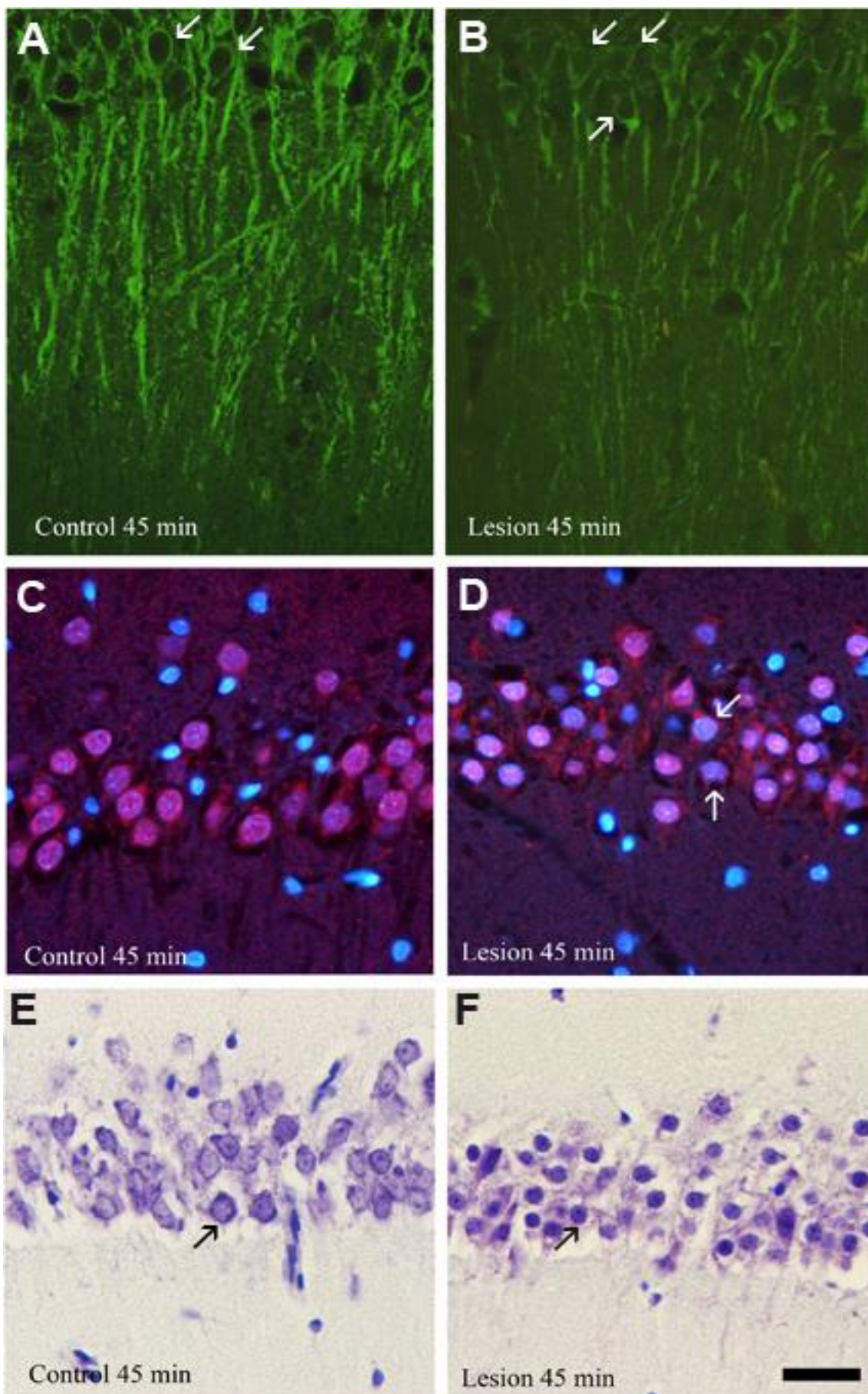
También evaluamos el estado del núcleo mediante el marcaje de NeuN, proteína que se localiza específicamente en neuronas y preferentemente en el núcleo, aunque puede encontrarse también en el citoplasma. En nuestra preparación observamos una reducción significativa del contenido de NeuN de algunas neuronas piramidales de la región CA1 (Fig. 4.30D) respecto a la situación control (Fig. 4.30C). Aunque en todos los casos observados esta reducción no es completa y siempre se detecta algo de inmunotinción en el núcleo, lo que constata que son los núcleos de las neuronas piramidales los que sufren este cambio. Además, también se observa una reducción del tamaño nuclear y un cambio de su forma.

Estas alteraciones en el tamaño y forma del núcleo de las neuronas piramidales de la región CA1 se visualizan mejor con la tinción de Nissl, utilizando el violeta de cresilo como colorante. En nuestra preparación el núcleo en las neuronas expuestas a hipoxia presentan un tamaño bastante menor así como una forma bastante más redondeada (Fig. 4.30F) que en la preparación control (Fig. 4.30E). Además el nucleoplasma presenta una tinción más intensa, lo que implica un cambio de sus

propiedades químicas. Todos estos cambios conducen a una reducción muy significativa del número de neuronas con una apariencia normal.

No hemos observado cambios apoptóticos que sean detectables con la prueba de TUNEL (ensayo “TdT-mediated dUTP Nick-End labeling”), la cual detecta la fragmentación del DNA característica de la apoptosis. Tampoco hemos observado tinción con fluorojade B de las neuronas, marcador específico de neurona en degeneración.

Fig. 4.30. **Cambios histológicos producidos en una rodaja en la que el fEPSP no se recuperó tras 40 minutos de hipoxia y Plasma1.** Todas las imágenes corresponden a la región CA1 del hipocampo y en ellas se pueden observar las neuronas piramidales. En (A) y (B) se muestra la inmunotinción de la proteína β -tubulina isotipo 3 en color verde, las flechas señalan los cuerpos de las neuronas piramidales. En (C) y (D) se representa una inmunotinción de la proteína NeuN de color rosado, una proteína específica del nucleó neuronal. En color azul se observa la tinción de Hoechst que marca el ADN. Las flechas señalan núcleos donde la pérdida de NeuN es más evidente. En (E) y (F) se muestra la tinción de Nissl utilizando el colorante violeta de cresilo que colorea de un tono violeta el nucleoplasma y parte de las estructuras citoplasmáticas como los ribosomas (cuerpos de Nissl). Las flechas señalan en (E) un ejemplo de núcleo en buen estado y en (F) un núcleo con la lesión característica observada en nuestra preparación. La escala de 30 μ m usada fue la misma para todas las imágenes.



Con todas estas pruebas hemos podido comprobar cómo en una rodaja, en la que el fEPSP se deprime irreversiblemente tras un periodo de hipoxia y exposición a Plasma1, se producen importantes cambios morfológicos que afectan tanto a su funcionalidad como a su supervivencia, y estos cambios son visibles tan solo 40 minutos después de la hipoxia.

4.4.4. Hipoxia y medio hiposmótico

A la vista de los resultados presentados en el apartado anterior nos planteamos si el incremento de volumen celular que se produce durante la aplicación de Plasma (ver apartado 4.3.2) podría mediar la depresión irreversible del fEPSP en condiciones de hipoxia. Para ello realizamos una serie de experimentos en los que provocamos el hinchamiento celular exponiendo la rodaja a un medio hiposmótico en vez de aplicar aminoácidos.

Realizamos unos experimentos con una solución KRB en la que redujimos la concentración de NaCl en 25 mM ($248,5 \pm 0,9$ mOsm; $n = 18$) (Fig. 4.31). Escogimos esta osmolaridad porque en los experimentos en los que disminuíamos gradualmente la osmolaridad (Fig. 4.15) fue con la que conseguimos un incremento del fEPSP similar al provocado por Plasma1. Esta solución hiposmótica en normoxia provocó un crecimiento rápido del fEPSP y del FV, que se mantuvo potenciado hasta el final de la aplicación. Durante el lavado, ambas señales quedaron por debajo de los valores basales ($63,3 \pm 3,3\%$ para el fEPSP; $p < 0,001$ y $67,1 \pm 3,8\%$ para el FV; $p < 0,001$; $n = 6$).

La aplicación de la solución hiposmótica en hipoxia (Fig. 4.31) no modificó el curso temporal de la recuperación del fEPSP y FV durante la reperusión de la solución oxigenada e isosmótica ($p = 0,157$ y $p = 0,184$ para las comparaciones del fEPSP y del FV, respectivamente).

Dado que el medio hiposmótico no facilita la aparición de efectos deletéreos durante la hipoxia, decidimos comprobar si la presencia de glutamato ($110 \mu\text{M}$) y aspartato ($10 \mu\text{M}$) podría desencadenarlos. Anteriormente mostramos (Fig. 4.25) que la presencia de glutamato y aspartato no modificaba los efectos de la hipoxia sobre el

fEPSP y el FV. En un nuevo grupo de experimentos (Fig. 4.32A y B) observamos que la presencia de estos dos aminoácidos tampoco alteraba las reducciones del fEPSP y FV provocadas por el medio hiposmótico en normoxia (fEPSP: $68,1 \pm 3,2\%$; $p = 0,364$; t-test; y FV: $70,4 \pm 4,6\%$; $p = 0,654$; t-test). Como tampoco modificaron los efectos sobre el fEPSP y FV causados por el medio hiposmótico en hipoxia (fEPSP, $p = 0,957$; test de Mann-Whitney; FV: $92,8 \pm 8,9\%$ al final del periodo de lavado, $p = 0,057$, test de Mann-Whitney). Sin embargo, en algunos de estos últimos experimentos (3 de 10) se observó una depresión del fEPSP mucho mayor de la obtenida por la aplicación del medio hiposmótico en hipoxia sin aminoácidos excitadores (Fig. 4.32C). Es de destacar que en varios de los experimentos en los que el fEPSP no se recuperó, el FV se quedó totalmente deprimido durante el periodo de hipoxia, recuperándose durante el lavado.

Por tanto las concentraciones plasmáticas de glutamato y aspartato no fueron suficientes para hacer que un medio hiposmótico en condiciones de hipoxia tuviese consecuencias irreversibles sobre el fEPSP. Nos planteamos si tal efecto deletéreo se podría provocar con concentraciones más elevadas de ambos aminoácidos.

En estos experimentos utilizamos el doble de la concentración plasmática de estos aminoácidos: glutamato ($220 \mu\text{M}$) y aspartato ($20 \mu\text{M}$). La aplicación conjunta de glutamato ($220 \mu\text{M}$) y aspartato ($20 \mu\text{M}$) con el medio hiposmótico en normoxia no modificó el efecto que causaba este último en solitario (fEPSP: $69,8 \pm 3,2\%$; $p = 0,222$; t-test; FV: $63,7 \pm 5,9\%$; $p = 0,507$; t-test). Pero glutamato ($220 \mu\text{M}$) y aspartato ($20 \mu\text{M}$) sí causaron efectos deletéreos sobre el fEPSP cuando se aplicaron en hipoxia ($35 \pm 11,8\%$ al finalizar el lavado) (Fig. 4.32D), causando una depresión inferior a un 55%, que sería el límite inferior provocado únicamente por la presencia del medio hiposmótico en un 60% de los experimentos realizados (Fig. 4.32F).

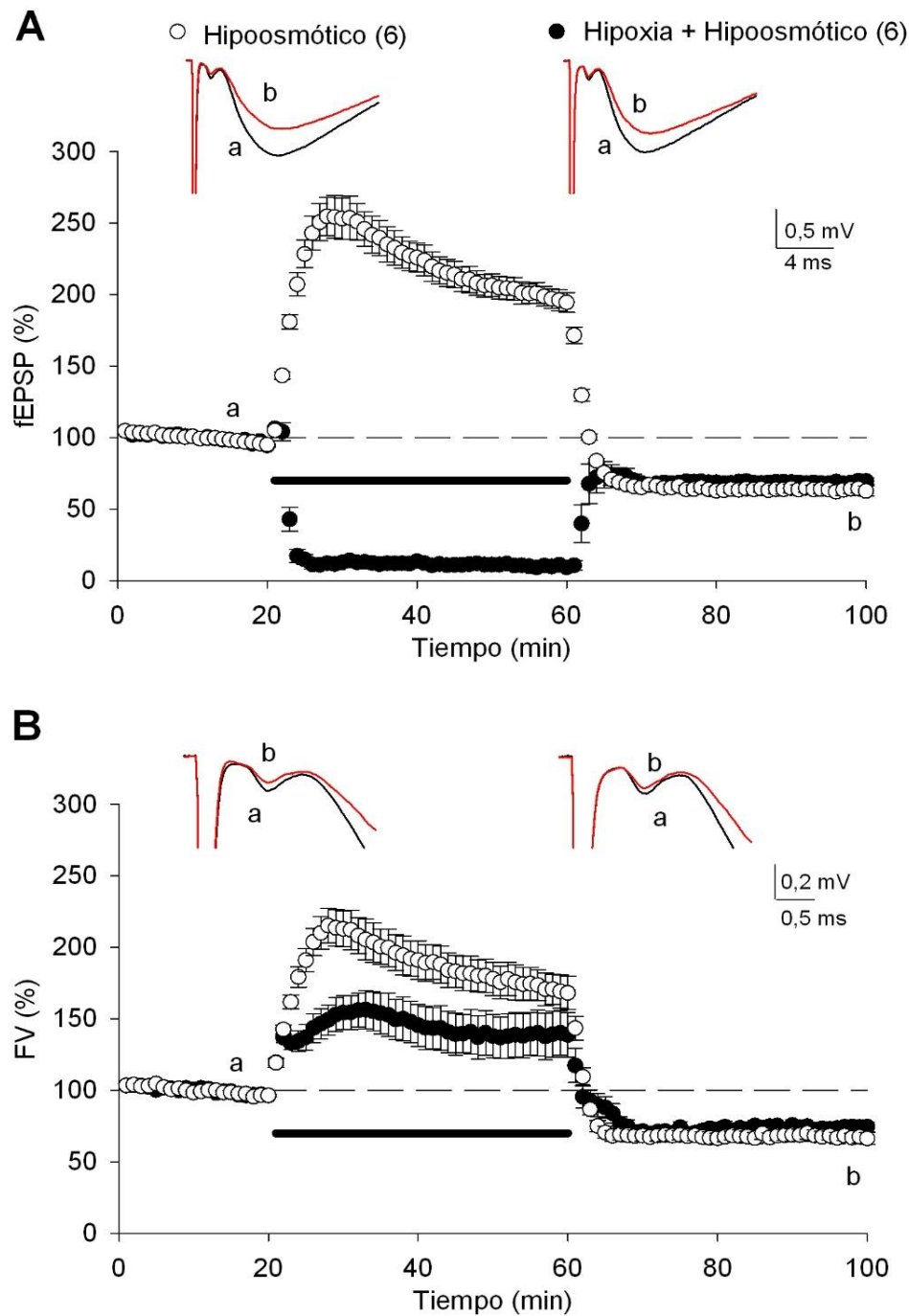


Fig. 4.31. El hinchamiento celular ocasionado por un medio hiposmótico no modifica la recuperación del fEPSP tras un periodo de hipoxia. Los círculos blancos muestran los cursos temporales del fEPSP (A) y el FV (B) en los experimentos en los que se aplicó un medio hiposmótico ($248,5 \pm 0,9$ mOsm) indicado por la barra negra horizontal. Los círculos negros muestran los experimentos en los que el medio hiposmótico se aplicó en hipoxia. Los trazados mostrados en (B) son ampliaciones de los representados en (A) para apreciar mejor los cambios en el FV.

Provocaron también una gran potenciación del FV al final del periodo de hipoxia ($252,4 \pm 35,6\%$), que volvió a valores basales durante el lavado (Fig. 4.32E). Este efecto no fue modificado cuando glutamato ($220 \mu\text{M}$) y aspartato ($20 \mu\text{M}$) se aplicaron con el medio hiposmótico en hipoxia (fEPSP: $26,1 \pm 11,5\%$; $p = 0,663$; test de Mann-Whitney; FV: $100 \pm 10,4\%$; $p = 0,809$; t-test). Únicamente se observaron más experimentos en los que el fEPSP quedó por debajo del 55% (8 de 10 experimentos), y en el FV se produjo una reducción total de la señal al final del periodo de hipoxia en 4 de 10 experimentos, que luego se recuperó en el lavado.

En resumen, el medio hiposmótico es menos eficaz que los aminoácidos de la mezcla Plasma1 para promover el efecto irreversible de la hipoxia. Además, el doble de la concentración plasmática de glutamato y aspartato es suficiente para empeorar de forma notable la recuperación del fEPSP tras el periodo de hipoxia.

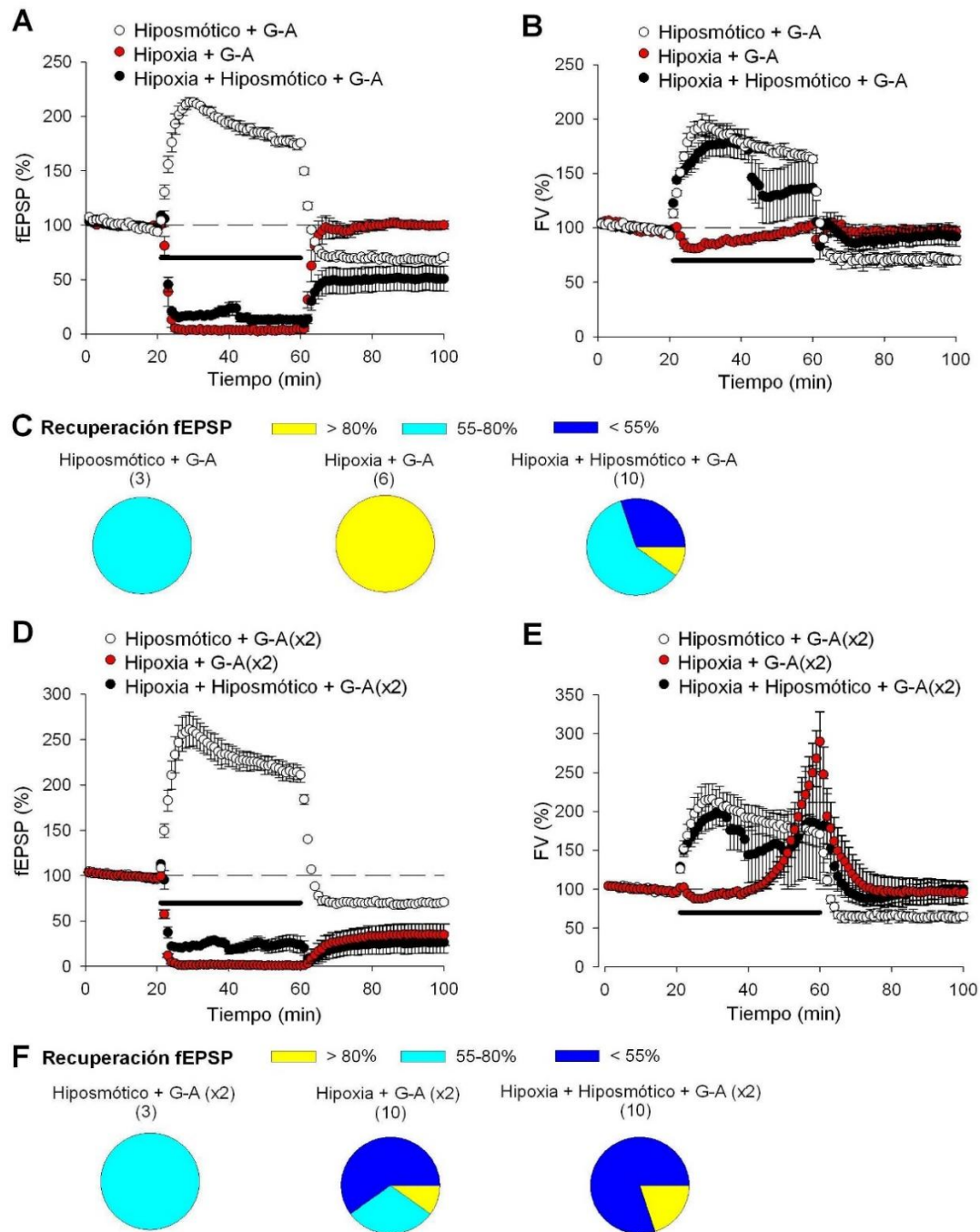


Fig. 4.32. Influencia del glutamato y aspartato sobre los efectos causados por el medio hiposmótico, la hipoxia o ambos sobre el fEPSP y el FV. Se muestran los cursos temporales del fEPSP (A, D) y del FV (B, E) en las siguientes condiciones experimentales: medio hiposmótico junto a glutamato 110 μ M y aspartato 10 μ M (G-A) (círculos blancos, n = 3); hipoxia + (G-A) (círculos rojos, n = 6); e hipoxia + hiposmótico +GA (círculos negros, n = 10). En (C) se representa tres rangos de recuperación del fEPSP al final del periodo de lavado (media de los 5 últimos minutos) en las tres situaciones experimentales. Los cursos temporales del fEPSP (D) y del FV (E) de los experimentos en las mismas situaciones que (A) y (B) pero usando una concentración de glutamato de 220 μ M y de aspartato de 20 μ M. (F) Grado de la recuperación del fEPSP en los experimentos usados para la figura D.

5. DISCUSIÓN

En el estudio de la lesión hipoxia/isquemia el efecto de excitotoxicidad provocado por los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato es el que más atención ha atraído, mientras que apenas hay estudios sobre la relevancia que podrían tener otros aminoácidos no excitotóxicos. En este trabajo mostramos evidencias de que la presencia de tales aminoácidos a concentraciones plasmáticas es capaz de exacerbar el efecto deletéreo de los aminoácidos neurotóxicos durante un periodo de hipoxia.

Los aminoácidos responsables de este efecto son capaces de provocar cambios en la transmisión sináptica si se aplican en rangos de 1 a 10 mM, como ya se había descrito para taurina en trabajos previos (Galarreta et al., 1996; del Olmo et al., 2000; 2003; 2004; Chepkova et al., 2002; Sergeeva et al., 2003; Dominy et al., 2004; Franconi et al., 2004; Yu et al., 2005). Este efecto estaría mediado principalmente por procesos relacionados con cambios en el volumen celular.

5.1. INCREMENTO DE LA EFICACIA SINÁPTICA Y DE LA EXCITABILIDAD AXONAL POR AMINOÁCIDOS

El objetivo inicial que nos llevó a emprender este estudio fue el de encontrar el sistema o sistemas de transporte involucrados en los cambios duraderos de la eficacia sináptica provocados por la aplicación de taurina. Como ya comentamos en la Introducción, el transportador de taurina TauT no parece ser el responsable de este fenómeno de potenciación dada la alta afinidad del transportador y la persistencia del fenómeno en ratones nulos para TauT (Sergeeva et al., 2003). En los experimentos realizados para probar nuestra hipótesis de partida de que el transportador PAT1 era el inductor del proceso de potenciación sináptica y axonal provocado por taurina, hemos encontrado otros 11 aminoácidos que aplicados individualmente a concentraciones de 10 mM también producen ese mismo efecto con un perfil temporal muy parecido (Fig. 4.3). Estos aminoácidos son L-alanina, D-alanina, L-glutamina, β -GPA, glicina, L-histidina, L-serina, D-serina, sarcosina, L-treonina y D-

treonina, los cuales muestran una gran variedad estructural. Algunos de estos aminoácidos son capaces de provocar la potenciación duradera del fEPSP a través de la activación del receptor NMDA, como es el caso de glicina (Watanabe et al., 1992; Shahi y Baudry, 1993), D-serina (Yang et al., 2003; Rosenberg et al., 2013) o L-prolina (Cohen y Nadler, 1997). Estos aminoácidos a la concentración de 10 mM pueden activar los receptores NMDA (Pace et al., 1992) y provocar la pérdida total e irreversible del fEPSP (signo de lesión neuronal) (Wallis, et al., 1995; Newell et al., 1997) razón por la que en nuestros experimentos fueron aplicados en presencia del antagonista NMDA, MK-801. Por lo tanto, de estos experimentos con los receptores NMDA bloqueados concluimos que los receptores NMDA no participan en las potenciaciones inducidas por la aplicación de D-alanina, L-alanina, glicina, D-serina y L-serina. En el caso de glutamina existían evidencias previas de que afectaba a los EPSP (Chaudhry et al., 2002; Kolbaev y Draguhn, 2008). Con el resto de los aminoácidos de este grupo, L-histidina, sarcosina, L-treonina, D-treonina y β -GPA, nuestros experimentos muestran por primera vez su capacidad de potenciación de la transmisión sináptica. En el caso del β -GPA, otro grupo de investigadores (Dominy et al., 2004) que realizó experimentos muy similares a los nuestros, no obtuvo ningún cambio en el fEPSP, discrepancia para la que no tenemos ninguna explicación.

De forma similar a los efectos inducidos por la taurina sobre el FV (Galarreta et al., 1996; del Olmo et al., 2000, 2003, 2004; Chepkova et al., 2002; Yu et al., 2005), estos aminoácidos potenciadores también provocan un aumento duradero de este potencial (Fig. 4.3), es decir, del número de fibras reclutadas con el impulso eléctrico, lo que explica, al menos en parte, el aumento del fEPSP producido por todos estos aminoácidos. No obstante, también detectamos que la mayoría de estos aminoácidos potenciadores (excepto histidina, sarcosina y D-treonina) provocan cambios duraderos de la eficacia sináptica. Este aumento de la eficacia sináptica alcanza una meseta a partir de los primeros 10 minutos de la fase de lavado, lo que significa que el decremento del fEPSP durante el lavado es debido principalmente a la disminución del FV. Estas potenciaciones duraderas de la eficacia sináptica no tuvieron, en general, ningún componente presináptico que afectase a la probabilidad de liberación del glutamato, a juzgar por la falta de modificaciones en el paradigma de pares de pulsos.

Hay que resaltar que aunque los diferentes aminoácidos potenciadores provocan un perfil uniforme de cambios durante el periodo de lavado, muestran claras diferencias durante su aplicación. Las reducciones del fEPSP pueden estar ocasionadas por inhibiciones (tanto presinápticas como postsinápticas) o por grandes despolarizaciones postsinápticas. En esta tesis no hemos realizado experimentos para desentrañar los mecanismos de los cambios observados, pero podemos apuntar que pueden ser tan opuestos como la hiperpolarización y el aumento de conductancia, provocados durante la aplicación de taurina (Taber et al., 1986; Bureau y Olsen, 1991; del Olmo et al., 2000) o la despolarización y disminución de conductancia que mostramos aquí para L-treonina. El β -GPA es otro aminoácido que provoca una completa desaparición del fEPSP durante su aplicación, resultado que se puede explicar por su conocida activación de los receptores GABA_A y GABA_B (Morris et al., 1983; Barolet et al., 1985; Kerr et al., 1994). Por otra parte, se sabe que la aplicación de L-glutamina es capaz de despolarizar interneuronas localizadas en la región CA1 del hipocampo a través del transportador electrogénico SNAT1, el cual está fuertemente expresado en estas células (Chaudhry et al., 2002), y también provoca la despolarización de neuronas hipocámpales en cultivo por un mecanismo parcialmente dependiente de receptores de glutamato (Kolbaev y Draguhn, 2008).

En definitiva, teniendo en cuenta las anteriores consideraciones podemos sugerir que los cambios duraderos del fEPSP y FV son independientes de las modificaciones agudas que estos aminoácidos causan sobre las propiedades intrínsecas de la membrana neuronal.

Sin embargo, no todos los aminoácidos estudiados provocan este efecto de potenciación, ya que hasta 7 aminoácidos (L-arginina, betaína, L-leucina, L-metionina, L-prolina, D-prolina y L-valina) modificaron en menos de un 10% el fEPSP al finalizar el experimento (Fig. 4.4). Estos resultados nos muestran que el efecto de potenciación del fEPSP y del FV no es común a todos los aminoácidos, por lo que los sistemas de transporte que participan en estos procesos de potenciación deben mostrar una determinada especificidad y estos aminoácidos no potenciadores nos pueden ayudar a establecer los mejores transportadores candidatos a estar implicados en los procesos de potenciación.

Dado que el mecanismo propuesto para explicar la potenciación inducida por la taurina es su captación al interior celular, en nuestros experimentos medimos la acumulación de los diferentes aminoácidos aplicados. Estos experimentos pusieron de manifiesto la existencia de una correlación positiva entre la cantidad del aminoácido acumulado con la magnitud de la potenciación del fEPSP.

Para todos los aminoácidos potenciadores a los que se ha podido medir la cantidad acumulada de aminoácido aplicado han mostrado una clara ganancia neta en el contenido total de aminoácidos que va desde los $13,1 \pm 2,3$ nmol/rodaja con D-treonina hasta los $44,3 \pm 2,1$ nmol/rodaja con glicina. Esta ganancia es provocada principalmente por la acumulación del aminoácido aplicado, aunque con algunos aminoácidos se observó también una variación significativa en el contenido de otros aminoácidos de la rodaja. De todas formas, tanto la acumulación del aminoácido aplicado como el contenido total de todos los aminoácidos de la rodaja se correlacionan positivamente con el nivel de la potenciación sináptica alcanzada. Glicina y L-glutamina producen ambos un incremento significativo del contenido total del resto de aminoácidos, este incremento es más acusado en aminoácidos para los que tienen una relación directa en su síntesis como son serina, y glutamato y aspartato, respectivamente (Nelson y Cox, 2005). L-histidina y L-treonina ocasionan una disminución en el contenido total del resto de aminoácidos que se ve compensado en gran medida por la acumulación del aminoácido aplicado, especialmente con L-histidina. En ambos casos los aminoácidos que más disminuyen son los aminoácidos excitadores, en el caso de L-histidina este efecto puede ser debido a su interacción con los transportadores de glutamina mediante los que interfiere en el ciclo glutamato-glutamina, promoviendo la acumulación del segundo y facilitando la depleción del primero (Rae et al., 2003). En este mismo sentido es posible que L-treonina realice un efecto similar al interactuar con el transportador ASCT2 al cual también se le implica en el ciclo glutamato-glutamina (Torres-Zamorano et al., 1998; Bröer et al., 1999). Por su parte los aminoácidos no potenciadores apenas modifican el contenido total de aminoácidos en la rodaja, incluyendo el aminoácido aplicado, lo que indica que la acumulación está ligada a la potenciación.

Todas las modificaciones que producen los aminoácidos aplicados en su concentración y en la del resto de aminoácidos vienen recogidas en la tabla 4.1. Esta tabla proporciona mucha información de la que queremos resaltar que los aminoácidos neurotransmisores glutamato y GABA no aumentaron significativamente con ninguno de los aminoácidos aplicados. Sí se observó una reducción del contenido de glutamato tanto con aminoácidos potenciadores (β -GPA, L-his, L-thr) como no potenciadores (bet, L-leu, L-met). También se consiguió disminuir el contenido de GABA cuando se aplicaron betaína, β -GPA, o taurina, que pueden actuar como sustratos de los transportadores de GABA (Liu et al., 1993; Ikeda et al., 2012) por lo que es posible que estos aminoácidos hayan provocado la liberación de GABA a través del transportador por un proceso de heterocambio. La reducción de GABA provocada por la sarcosina y la D- y L-prolina podría estar mediada a través del transportador PAT1, aunque otro buen sustrato de este transportador como L-alanina no modifica el contenido de GABA en la rodaja. Es muy llamativa la disminución de GABA y taurina causada por la aplicación de L-treonina ya que no se conoce ningún sistema de transporte que tenga como sustrato a estos tres aminoácidos.

En resumen, los variados cambios en el perfil de aminoácidos de las rodajas no parecen tener relación con las modificaciones duraderas de la transmisión sináptica provocadas por la aplicación individual de aminoácidos.

5.2. TRANSPORTADORES IMPLICADOS EN LOS PROCESOS DE POTENCIACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA Y EXCITABILIDAD AXONAL

Hemos visto que 12 aminoácidos comparten un mismo comportamiento de potenciación del fEPSP y del FV ¿Podría ser este efecto explicado por la existencia de un sistema de transporte de las características del PAT1 como propusimos en nuestra hipótesis inicial? Teniendo en cuenta nuestros datos podemos contestar que no, por las siguientes razones: por una parte los aminoácidos que no son sustratos del PAT1 como L-serina, L-treonina o D-treonina (Boll et al., 2003; Chen et al., 2003;

Metzner et al., 2006) son capaces de potenciar el fEPSP y el FV, por otra parte los aminoácidos que son muy buenos sustratos del PAT1 como la L- o D-prolina, o la betaína (Boll et al., 2003; Metzner et al., 2006; Thondorf et al., 2011) son incapaces de provocar esas potenciaciones. El comportamiento de estos aminoácidos nos lleva a concluir que el PAT1 no está involucrado en los procesos de potenciación estudiados.

Pese a descartar al PAT1 como transportador inductor del proceso de potenciación, seguimos manteniendo la hipótesis de que es necesario un sistema de transporte para el incremento de la transmisión sináptica y excitabilidad axonal estudiado. Dada la amplia variedad de aminoácidos capaces de producir el incremento del fEPSP y FV (lo que implica unos mecanismos de inducción localizados tanto en axones como en dendritas) y dado que no se conoce ningún transportador capaz de transportar a todos los aminoácidos que aquí se describen como potenciadores, pensamos que estarían involucrados varios sistemas de transporte en estos procesos de potenciación.

Para ser coherentes con nuestros datos, estos hipotéticos transportadores deberían tener baja afinidad por los sustratos, alta capacidad de transporte y estar convenientemente expresados en la región CA1 del hipocampo. Además, sería más adecuado que mostraran un tipo de transporte que favoreciera la acumulación de partículas como es el cotransporte en vez del intercambio de aminoácidos entre el medio extra- e intracelular (Bröer, 2002).

Aprovechando la gran variedad de aminoácidos que hemos utilizado y que mostraban diferente facultad potenciadora, hemos intentado aparejar el perfil de sustratos de diferentes transportadores candidatos con el efecto potenciador de esos sustratos. Se han elegido varios transportadores que cumplieran las características mínimas para ser candidatos.

	SNAT1	SNAT2	SNAT3	SNAT5	GAT2	GAT3	PAT1	PAT2	ASCT2
L-ALA	B _(1,2,3)	B _(3,4,5)	S _(7,8)	B ₍₉₎	N ₍₁₂₎		B _(13,14,15)	B _(17,18)	B _(19,20,21)
D-ALA	I ₍₃₎						B _(13,14)	B _(17,18)	N ₍₁₉₎
β-GPA					B _(11,12)	B ₍₁₁₎	B ₍₁₆₎		
L-GLN	B _(1,2,3)	B _(3,4,5)	B _(7,8)	B _(9,10)			N ₍₁₃₎		B _(19,20,21)
GLY	B _(1,2,3)	B _(3,4,5)		B _(9,10)			B _(13,14,15)	B _(17,18)	S _(19,21)
L-HIS	B _(1,2,3)	B _(3,4,5)	B _(7,8)	B _(9,10)					N _(19,21)
SAR							B _(14,15)	B _(17,18)	
L-SER	B _(1,2,3)	B _(3,4,5)		B _(9,10)			N _(13,14,15)	S _(17,18)	B _(19,20,21)
D-SER							S _(13,14,15)	S _(17,18)	B _(19,20)
TAU					B _(11,12)	B ₍₁₁₎	B ₍₁₅₎	N ₍₁₈₎	
L-THR	S _(1,2,3)	S _(3,5)					N ₍₁₃₎		B _(19,20,21)
D-THR							N ₍₁₃₎		B ₍₁₉₎
L-ARG	N _(1,2,3)	N _(3,4,5)	N ₍₈₎	N ₍₉₎					N ₍₂₀₎
BET	N ₍₆₎	S ₍₆₎	N ₍₆₎		N _(11,12)	N ₍₁₁₎	B _(14,15)	S _(17,18)	
L-LEU	N _(1,2,3)	S _(3,5)	N ₍₈₎	N ₍₁₀₎			N _(13,15)	N ₍₁₈₎	S _(19,21)
L-MET	B _(1,3)	B _(3,4,5)							S _(19,21)
L-PRO	S _(1,2,3)	B _(3,4,5)		N _(9,10)			B _(13,15)	B _(17,18)	N _(19,20,21)
D-PRO							B _(13,15)	B _(17,18)	
L-VAL	S _(1,3)						N _(13,15)		S ₍₁₉₎

Tabla 5.1 Cada fila representa uno de los aminoácidos probados en nuestros experimentos, estando en la parte superior los aminoácidos potenciadores y en la parte inferior los no potenciadores. Cada columna muestra uno de los transportadores candidatos. Se califica como buen sustrato (B) cuando la captación ha sido probada o al menos muestra afinidad elevada por el aminoácido correspondiente. Sustrato intermedio (I) se refiere a sustratos con baja afinidad cuya captación no estaría probada o en casos de información contradictoria. No sustrato (N) se califica cuando ha sido probado que el aminoácido no es captado por el transportador o exhibe una afinidad casi inexistente por él. En color verde están marcados los aminoácidos potenciadores que son sustratos y los no potenciadores que no son sustratos del transportador analizado. En color rojo están los aminoácidos potenciadores que no son sustratos y los no potenciadores que sí lo son. El color amarillo se utiliza siempre para los sustratos intermedios.

(1) Albers et al., 2001; (2) Chaudhry et al., 2002; (3) Mackenzie et al., 2003; (4) Hatanaka et al., 2000; (5) Young et al. 2010; (6) Nishimura et al., 2014; (7) Gu et al., 2000; (8) Fei et al., 2000; (9) Nakanishi et al., 2001a; (10) Baird et al., 2004; (11) Liu et al., 1993; (12) Ikeda et al., 2012; (13) Chen et al., 2003; (14) Boll et al., 2003; (15) Metzner et al., 2006; (16) Metzner et al., 2009; (17) Foltz et al., 2004; (18) Kennedy et al., 2005; (19) Utsunomiya et al., 1996; (20) Gliddon et al., 2009; (21) Pingitore et al., 2013

El transportador SNAT5 (SLC38A5) sería uno de los mejores candidatos para estar involucrado en estos procesos de potenciación, ya que todos los sustratos conocidos para este transportador muestran un efecto potenciador, mientras que los que no muestran ninguna afinidad por él, no son potenciadores (tabla 5.1). Este transportador, perteneciente a la familia SNAT y dentro de esta familia al sistema N, es un sistema de cotransporte con una ganancia neta en el contenido de aminoácidos y electroneutro. Estos transportadores se expresan abundantemente en el hipocampo, sobretodo en la glía (Cubelos et al., 2005). De esta familia también hay que tener en cuenta al SNAT3, ya que tampoco posee ninguno de nuestros aminoácidos no potenciadores como sustrato y también localiza en astrocitos del hipocampo aunque en menor proporción que el SNAT5 (Boulland et al., 2002; Cubelos et al., 2005).

Respecto al transportador que mediaría la acción de taurina, cuya búsqueda fue el punto de partida de esta investigación, parece que la familia de transportadores de GABA (GAT) sería la mejor posicionada. Como puntos favorables muestran que promueven la acumulación de partículas, tienen carácter electrogénico, tienen una baja afinidad por taurina (Liu et al., 1993) y además poseen una dependencia de sodio que coincide con lo observado en la potenciación producida por taurina (Galarreta et al., 1996). El mayor inconveniente que muestran es que su expresión en hipocampo es escasa aunque sí que han sido encontrados en esta estructura (Ahn et al., 1996; Borden, 1996; Ribak et al., 1996; Conti et al., 1999; Lee et al., 2006). En anteriores trabajos en nuestro grupo (del Olmo et al., 2004) y en otros laboratorios (Sergeeva et al., 2003) se contempló la posibilidad de que la potenciación inducida por taurina estuviese mediada por estos transportadores de GABA, pero se rechazó (sobre todo la participación del subtipo GAT1) en base a experimentos farmacológicos (del Olmo et al., 2004). Actualmente volvemos a considerar a GAT2 y GAT3 como posibles candidatos pues muestran un perfil de sustratos que se ajustaría adecuadamente al comportamiento de los β -aminoácidos (tabla 5.1).

Respecto a la captación de L-treonina, uno de los aminoácidos más estudiados en este trabajo, no tenemos un óptimo candidato, pero el que más requisitos cumpliría es el transportador de alanina, serina, cisteína y treonina 2 (ASCT2). Este transportador, que se encuentra expresado en dendritas del *stratum radiatum* del

hipocampo (Gliddon et al., 2009), posee una amplia variedad de sustratos y entre los mejores se encuentran principalmente aminoácidos potenciadores como L-alanina, L-glutamina, L-serina, D-serina, L-treonina o D-treonina, mostrando la capacidad de transportar de isómeros D- y L- casi por igual (Utsunomiya-Tate et al., 1996). Sin embargo algunos aminoácidos no potenciadores como L-leucina, L-metionina o L-valina muestran una afinidad inferior pero suficiente para ser sustratos en nuestras condiciones experimentales. Además la afinidad que muestra por sus mejores sustratos, en torno a 0,1 mM (Bröer et al., 1999), encaja mal con las concentraciones elevadas que necesitamos para observar el efecto. Otro inconveniente que muestra es que funciona como un intercambiador de aminoácidos de manera dependiente de sodio por lo que a diferencia de los anteriores candidatos no aumentaría el contenido neto de aminoácidos.

5.3. EL INCREMENTO DE VOLUMEN CELULAR ES UNO DE LOS PRINCIPALES RESPONSABLES DE LA POTENCIACIÓN SINÁPTICA Y AXONAL

Nuestros resultados indican que varios transportadores de aminoácidos están implicados en los cambios de eficacia sináptica y de la excitabilidad axonal inducidos por los aminoácidos, en consecuencia, tales transportadores (junto con la maquinaria necesaria para producir la potenciación) deberían estar presentes tanto en las dendritas como en los axones. Esta posibilidad nos parece altamente especulativa, por lo que pensamos en una explicación más simple que pudiera ser común para todos los transportadores, aunque estuviesen expresados en una única localización celular. Nuestra propuesta se basa en un incremento de volumen celular producido por la acumulación de partículas y por consiguiente, una disminución del volumen extracelular. El aumento de resistividad ocasionado por la reducción del espacio extracelular modificaría de forma proporcional los potenciales registrados extracelularmente como es el caso de los fEPSP y FV. En nuestros experimentos hemos observado aumentos o disminuciones de los potenciales extracelulares dependiendo de si se aplicaba un medio de perfusión hiposmótico (que reducía el espacio

extracelular) o hiperosmótico (que aumentaba el espacio extracelular), respectivamente, de forma similar a lo publicado por otros investigadores (Andrew y MacVicar, 1994; Chebabo et al., 1995a; Nakajima et al., 2004; Andreasen y Nedergaard, 2017).

No obstante, el hecho de que la aplicación individual de los aminoácidos potenciadores en un medio hiperosmótico (para dificultar posibles aumentos del volumen celular) no modificase ninguno de los parámetros estudiados (fEPSP, FV, FV/fEPSP, contenido de aminoácidos y resistividad), nos hizo dudar de la importancia del incremento de volumen en los efectos provocados por esos aminoácidos. Una posible explicación a esta falta de efecto es que el medio hiperosmótico establezca un nuevo equilibrio osmótico desde el que se den unos cambios de volumen proporcionalmente similares a los obtenidos en condiciones isosmóticas. Nuestra comprobación de que la reducción progresiva de la osmolaridad del medio provoca cambios idénticos en los fEPSP y FV independientemente de si la solución de partida era isosmótica e hiperosmótica, afianza dicha posibilidad.

Nuestra propuesta de que la acumulación de partículas intracelulares, por la acción de los transportadores, incrementa el volumen celular y causa el aumento del fEPSP y del FV se sustenta en las siguientes evidencias experimentales:

1) Nuestros resultados muestran un incremento de la resistividad de la rodaja, parámetro que está directamente relacionado con cambios del volumen celular (Traynelis y Dingledine, 1989; Chebabo et al., 1995a,b), provocado por los aminoácidos potenciadores L-treonina y taurina, pero no por el aminoácido no potenciador L-leucina.

2) La substitución del cloruro por isetionato, un anión que no permea, redujo drásticamente los incrementos del fEPSP, FV y resistividad provocados por la perfusión de taurina y L-treonina. Además, la ausencia de cloruro causó una gran disminución en la acumulación de taurina y L-treonina. Estos resultados podrían ser explicados por la acción del cloruro en dos mecanismos. Por una parte, el cloruro es un elemento fundamental en el proceso de hinchamiento de los astrocitos (Galeffi et al., 2004; Kimelberg et al., 2006) y neuronas (Strange, 1993; Steffensen et al., 2015). Por otra, es

un elemento necesario para el funcionamiento de algunos transportadores como los GAT (Borden et al., 1992; Kavanaugh et al., 1992) lo que afectaría a la captación de aminoácidos como taurina. Sorprende la gran reducción en la cantidad de treonina acumulada al disminuir el cloruro, dado que ninguno de los transportadores conocidos para este aminoácido requiere cloruro para su funcionamiento. Desconocemos si se trata de un efecto relacionado con la reducción del hinchamiento celular que afecte a la captación, o la existencia de un transportador dependiente de cloruro que tenga por sustrato a la L-treonina.

5.4. LOS AMINOÁCIDOS DEL PLASMA AUMENTAN LA EFICACIA SINÁPTICA Y LA EXCITABILIDAD AXONAL

Cabe preguntarse cuáles serían las condiciones fisiológicas en las que un aminoácido determinado, a una concentración muy superior a la que se puede encontrar en el espacio extracelular, potencia la transmisión sináptica por un mecanismo que parece requerir la acumulación intracelular del aminoácido. Si consideramos que muchos de los aminoácidos que hemos utilizado comparten el mismo transportador (Palacín et al., 1998; Bröer, 2002), y que diferentes transportadores pueden actuar simultáneamente, es posible pensar que la aplicación conjunta de varios de ellos a sus concentraciones fisiológicas pudiera tener un efecto aditivo sobre la activación del transportador que fuese parecido al que hemos observado con altas concentraciones de un solo aminoácido.

En efecto, nuestros experimentos han puesto de manifiesto que una mezcla de aminoácidos que se asemeja en su composición y concentración a la del plasma (Nishimura et al., 1995; Lerma et al., 1986) provoca un aumento del fEPSP, del FV y de la eficacia sináptica, por un mecanismo que es parcialmente dependiente de la presencia extracelular de cloruro, características muy similares a las ocasionadas por altas concentraciones de un solo aminoácido. Aunque en esta ocasión, la reducción de la potenciación sináptica en ausencia de cloruro es menos drástica que la observada cuando se aplicó taurina o L-treonina en solitario, quizás debido a la implicación de una

mayor variedad de transportadores independientes de cloruro durante la perfusión de Plasma.

También hemos demostrado que la mayor parte del efecto potenciador de la mezcla Plasma está ocasionada por los aminoácidos que en su aplicación individual se revelaron potenciadores y que agrupamos en la mezcla denominada Plasma1 (L-alanina, glicina, L-glutamina, L-histidina, L-serina, taurina y L-treonina). Hay que resaltar que la adición de concentraciones plasmáticas de glutamato (110 μ M) y aspartato (10 μ M) a las mezclas Plasma1 y Plasma2 no ocasionó ninguna modificación en el efecto de estas mezclas sobre el fEPSP, FV, FV/fEPSP, ni la probabilidad de liberación (Fig. 4.23 y 4.24), pese a que el glutamato a esta concentración ocasiona la muerte de las neuronas corticales en cultivo (Choi et al., 1987). Esta diferencia de efecto puede ser debido a la existencia de potentes mecanismos de recaptura de glutamato y aspartato en la rodaja que hagan que la retirada de estos aminoácidos excitadores sea más eficaz que en el cultivo de neuronas (Schousboe y Hertz, 1981; Rosenberg y Aizenman, 1989; Rothstein et al., 1996).

5.5. LA MEZCLA DE AMINOÁCIDOS EXACERBA EL EFECTO DELETEREO DE LA HIPOXIA

Una lesión traumática o una lesión del endotelio vascular que suponga un deterioro de la barrera hematoencefálica desemboca en una extravasación de parte del contenido del plasma al líquido intersticial, entre los que se encuentran los aminoácidos (Westergren et al., 1994; Koizumi et al., 1997; Østergaard et al., 2013). Además se ha comprobado que en los episodios de hipoxia/isquemia la concentración extracelular de aminoácidos sufre un incremento acusado tanto en animales (Butcher et al., 1990; Shimada et al., 1990; 1993; Matsumoto et al., 1996) como en humanos, donde llegan a alcanzar valores semejantes a los que se encuentran en el plasma (Kanthan et al., 1995; Hutchinson et al., 2002). Se sabe que los aminoácidos excitadores, glutamato y asparto, son cruciales para el desarrollo de la neurotoxicidad en los fenómenos de hipoxia/isquemia (Simon et al., 1984; Rothman, 1984; Rothman y

Olney, 1986), donde llegan a alcanzar en el espacio extracelular sus concentraciones plasmáticas e incluso las superan (Benveniste et al., 1984; Hagberg et al., 1985; Choi y Rothman, 1990; Bullock et al., 1998). Del resto de aminoácidos hay mucha menos información sobre su posible participación en la hipoxia/isquemia, centrándose las investigaciones en los aminoácidos que pueden desarrollar una actividad excitadora como glicina o D-serina (Mustafa et al., 2010; Fuchs et al., 2012; Chen et al., 2015) o son sustratos de los aminoácidos excitadores como glutamina o alanina (Shank y Aprison 1981; Goldberg et al., 1988; Erecińska et al., 1994; Bröer y Brookes, 2001).

En nuestros experimentos hemos corroborado que un periodo de hipoxia de 40 minutos en la CA1 del hipocampo deprime total y reversiblemente el fEPSP, posiblemente debido a la activación de los receptores de adenosina A1 presinápticos (Sebastião et al., 2001; Tanaka et al., 2001). Esta situación no cambió cuando el periodo de hipoxia se acompañó por glutamato y aspartato a sus concentraciones plasmáticas, quizás debido a que en condiciones de hipoxia, la captación de glutamato sigue funcionando lo que puede reducir la concentración efectiva de glutamato en el espacio extracelular (Rao et al., 2001; Mitani y Tanaka 2003; Rothstein et al., 2005; Colleoni et al., 2008). Curiosamente, la mera presencia de Plasma durante la hipoxia fue suficiente para inducir cambios irreversibles en el fEPSP, incluso sin añadir glutamato y aspartato. Es más, la sola presencia de los siete aminoácidos potenciadores en la mezcla Plasma1 exacerbó el efecto deletéreo de la hipoxia. Incluso retirando la L-serina de esta mezcla (mezcla de 1,9 mM) se obtuvo el efecto lesivo sobre el fEPSP, no así cuando además se retiró la L-alanina (mezcla de 1,5 mM). No hemos determinado si para el efecto lesivo de estas mezclas es solo importante la concentración final de los aminoácidos de la mezcla o también la identidad de los mismos.

Una posible explicación de estos resultados es que los sistemas de transporte implicados en las potenciaciones sinápticas siguiesen funcionando durante la hipoxia lo que permitiría la captación de aminoácidos al interior celular, dando lugar a aumentos del volumen celular y por ende a un incremento de concentración de las sustancias que se encontrasen en el espacio extracelular. El mantenimiento o hiperpolarización del Vm descrito en neuronas en las primeras etapas del proceso de hipoxia refuerza

esta idea (Fujiwara et al., 1987; Grigg y Anderson, 1989; Hyllienmark y Brismar, 1999). Además, el hecho de que en nuestros experimentos la amplitud del FV incrementa durante el efecto deletéreo producido por las mezclas de aminoácidos durante la hipoxia, es un claro indicio de que en estas condiciones al menos el potencial de membrana de los axones se mantiene como para permitir la generación de potenciales de acción.

Muchas observaciones experimentales han demostrado que el desarrollo de neurotoxicidad en isquemia, hipoxia, infarto y traumatismo cerebral, está ligado a un aumento exacerbado de glutamato en el espacio extracelular. El glutamato no solo procede del vertido por la lisis de células, sino también del liberado por neuronas y glía mediante diferentes mecanismos (exocitosis, canales que se abren por cambios de volumen, reversión de transportadores...). No está claro cómo contribuyen estas diferentes fuentes de glutamato a su aumento en el espacio extracelular durante la isquemia: mientras que para algunos autores es mayoritario el glutamato liberado desde las sinapsis por potenciales de acción (Bosley et al., 1983; Benveniste et al., 1989; Katchman y Hershkowitz, 1993; Ye et al., 2010), para otros es la reversión de los transportadores de glutamato (Sánchez-Prieto y González, 1988; Madl y Burgesser, 1993; Rossi et al., 2000; Molz et al., 2008; Malarkey y Parpura, 2008; Gouix et al., 2009) o un aumento de la función del heterocambiador cisteína/glutamato (Soria et al., 2014; Massie et al., 2015; Hsieh et al., 2017). Una vez acumulado en el espacio extracelular, el glutamato activa masivamente sus receptores de tipo NMDA provocando un aumento excesivo de calcio en el citoplasma lo que finalmente da lugar a la muerte celular (Simon et al., 1984; Choi, 1987; Tymianski et al., 1993).

En nuestros experimentos hemos demostrado que se requiere la activación de los receptores NMDA para inducir el efecto lesivo causado por la mezcla Plasma1 durante la hipoxia. Esta activación no parece ser debida a la acción directa de los posibles coagonistas del receptor NMDA que se encuentran en la mezcla Plasma1 (L-alanina, glicina y L-serina), dado que cuando se aplicaron solo esos tres aminoácidos durante la hipoxia no se obtuvo el efecto lesivo sobre el fEPSP. También hemos demostrado que la presencia de los aminoácidos de la mezcla Plasma1 favorece la neurotoxicidad del glutamato y aspartato, ambos aplicados a concentraciones

plasmáticas (ver Fig. 4.29A), y que aumentando al doble la concentración plasmática de glutamato y aspartato se favorece la aparición del efecto lesivo tras un periodo de hipoxia (ver Fig. 4.32). Una posible explicación de estos datos es que la reducción del espacio extracelular ocasionada por la captación de los aminoácidos de la mezcla Plasma1 haga que aumente la concentración intersticial de los solutos, entre ellos los aminoácidos excitadores que alcanzarían la concentración efectiva para causar la neurotoxicidad. Esta hipótesis es compatible con el curso temporal de la potenciación que sufre el FV durante las intervenciones experimentales que fueron lesivas para el fEPSP. Conforme los aminoácidos se acumulan, el espacio extracelular se reduce progresivamente y en consecuencia aumenta paulatinamente la concentración de glutamato y aspartato en ese compartimiento lo que facilita la activación de sus receptores. La potenciación del FV también es dependiente de la activación de los receptores NMDA (ver Fig. 4.28C) posiblemente a través de unos receptores NMDA presinápticos que regulan la excitabilidad del axón (Suárez et al., 2005; Suárez y Solís, 2006). Es posible, por tanto, que el aumento de la amplitud del FV sea un índice de los niveles de glutamato que se alcanzan en el espacio extracelular.

No obstante, tenemos que señalar que la hipótesis de que el hinchamiento celular participa en el proceso nocivo de Plasma1 durante la hipoxia, no está soportada por la falta de efecto de un medio hiperosmótico sobre esos efectos deletéreos (ver Fig. 4.28B). El uso del medio hiperosmótico tendría el mismo principio que la utilización de manitol o salino en clínica en casos de infarto cerebral o hemorragia cerebral (Maas et al., 1997; EUSI, 2003; Adams et al., 2003; Bhardwaj y Ulatowski, 2004; Knapp, 2005). En nuestros resultados no se observa ninguna mejoría al usar el medio hiperosmótico frente a este tipo de lesión, lo que iría en el mismo sentido que la falta de resultados positivos observados en los ensayos clínicos para el uso del manitol en el tratamiento de la isquemia cerebral severa (Bereczki et al., 2007; Grände y Romner, 2012).

La irreversibilidad de la depresión del fEPSP provocada por Plasma1 tras su aplicación en hipoxia también tuvo sus manifestaciones histológicas compatibles con los daños tempranos encontrados por otros autores en procesos de isquemia: disminución de la β -tubulina isotipo 3 en neuronas de la región CA1 (Yoshimine et al.,

1985; Yanagihara et al., 1985; Yamamoto et al., 1987), reducción del contenido del marcador neuronal NeuN en algunas neuronas (Unal-Cevik et al., 2004; Li et al., 2014), reducción del tamaño del núcleo (Mennel y Müller, 1994) y drástica reducción en el número de neuronas con una apariencia normal (Mitani y Tanaka, 2003). Estas características histopatológicas implican profundos cambios en la funcionalidad y viabilidad de las neuronas de la región CA1, pero son necesarios estudios con un mayor tiempo tras la lesión para establecer si realmente son irreversibles y desembocan en procesos de muerte celular.

5.6. INFLUENCIA DEL AUMENTO DEL VOLUMEN CELULAR EN EL DAÑO CAUSADO POR LA HIPOXIA Y LOS AMINOÁCIDOS

El mero aumento de volumen celular provocado por la aplicación de una mezcla de aminoácidos o por un medio hiposmótico no es suficiente para provocar efectos deletéreos en la transmisión sináptica, incluso si esas condiciones experimentales se acompañan por concentraciones plasmáticas de los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato. Aunque de por sí tras la retirada de un medio hiposmótico se produce una reducción del fEPSP y del FV, ésta se atribuya a un efecto de la regulación de volumen que hace reaccionar a la célula al restaurar la osmolaridad normal como si esta fuera hiperosmótica (Chebabo et al., 1995a,b). En efecto, nosotros también hemos observado que la conjunción de un aumento de volumen (ya sea provocado por la mezcla Plasma1 o un medio hiposmótico), la presencia de los aminoácidos excitadores y la hipoxia provoca alteraciones irreversibles de la transmisión sináptica compatibles con las observadas en modelos de isquemia (Rothman, 1985; Choi, 1987; Andrew et al., 1996; MacGregor et al., 2003). Estos datos ponen de manifiesto que varios elementos que por sí solos no producen alteraciones irreversibles de la transmisión sináptica, pueden cooperar para desencadenar el proceso de daño isquémico.

Por otra parte, nuestros experimentos indican que el aumento de volumen celular provocado por la mezcla de aminoácidos es más pernicioso que el provocado

por un medio hiposmótico, ya que éste, aunque produce una potenciación del fEPSP similar a la que se consigue con la mezcla de Plasma¹, no favorece la aparición del efecto lesivo cuando acompaña a un periodo de hipoxia. No tenemos una explicación clara para esta diferencia, pero se podría pensar que la mezcla de aminoácidos tuviese un efecto pernicioso adicional que fuese independiente de su acumulación y aumento de volumen celular. Otra posibilidad, que no descarta la anterior, es que la hinchazón celular inducida por la mezcla Plasma y el medio hipotónico involucre a diferentes elementos celulares, de tal manera que las modificaciones del volumen extracelular no sean homogéneas entre ambos procedimientos.

6. CONCLUSIONES

1. Diferentes aminoácidos como alanina, glutamina, glicina, histidina, serina, taurina y treonina potencian la transmisión sináptica mediante un proceso que involucra la acumulación intracelular de los aminoácidos a través de su captación por al menos dos sistemas de transporte de baja afinidad.
2. La acumulación intracelular de esos aminoácidos provoca un aumento del volumen celular y por consiguiente una disminución del espacio extracelular, lo que aumentaría la resistividad del tejido modificando proporcionalmente los potenciales registrados extracelularmente.
3. En condiciones fisiológicas estos procesos tendrían lugar cuando esos siete aminoácidos potenciadores a sus concentraciones plasmáticas (Plasma1) entrasen en contacto con el parénquima cerebral.
4. La presencia de los aminoácidos de la mezcla Plasma1 durante un periodo de hipoxia exacerba y acelera el daño irreversible provocado por la activación de los receptores NMDA de glutamato.
5. Para desencadenar los efectos irreversibles de un periodo de hipoxia es más perjudicial la presencia de los aminoácidos Plasma1 que la de un medio hiposmótico, lo que sugiere que los aminoácidos, además del hinchamiento celular, provocan efectos adicionales que dificultan la recuperación durante la reoxigenación.
6. Proponemos que los sistemas de transporte de baja afinidad y alta capacidad para aminoácidos no considerados neurotóxicos son una nueva diana molecular que puede contribuir al daño celular causado por la isquemia cerebral.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams HP Jr, Adams RJ, Brott T, del Zoppo GJ, Furlan A, Goldstein LB, Grubb RL, Higashida R, Kidwell C, Kwiatkowski TG, Marler JR, Hademenos GJ; Stroke Council of the American Stroke Association (2003) Guidelines for the Early Management of Patients With Ischemic Stroke: A Scientific Statement From the Stroke Council of the American Stroke Association” *Stroke* 34 (4): 1056–83.
- Agulhon C, Rostaing P, Ravassard P, Sagné C, Triller A, Giros B (2003) Lysosomal Amino Acid Transporter LYAAT-1 in the Rat Central Nervous System: An in Situ Hybridization and Immunohistochemical Study. *J Comp Neurol* 462 (1): 71–89.
- Ahn J, Mundigl O, Muth TR, Rudnick G, Caplan MJ (1996) Polarized Expression of GABA Transporters in Madin-Darby Canine Kidney Cells and Cultured Hippocampal Neurons. *J Biol Chem* 271 (12): 6917–24.
- Albers A, Bröer A, Wagner CA, Setiawan I, Lang PA, Kranz EU, Lang F, Bröer S (2001) Na⁺ Transport by the Neural Glutamine Transporter ATA1. *Pflügers Arch* 443 (1): 92–101.
- Alexander SP, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA; CGTP Collaborators (2015) THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2015/16: Transporters. *Br J Pharmacol* 16 (172): 6110–6202.
- Anderson CM, Howard A, Walters JR, Ganapathy V, Thwaites DT (2009) Taurine Uptake across the Human Intestinal Brush-Border Membrane Is via Two Transporters: H⁺-Coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺- and Cl⁻-Dependent TauT (SLC6A6). *J Physiol* 587 (Pt 4): 731–44.
- Andreasen M, Nedergaard S (2017) Furosemide Depresses the Presynaptic Fiber Volley and Modifies Frequency-Dependent Axonal Excitability in Rat Hippocampus. *J Neurophysiol* 117 (4): 1512–23.
- Andrew RD, Adams JR, Polischuk TM (1996) Imaging NMDA- and Kainate-Induced Intrinsic Optical Signals from the Hippocampal Slice. *J Neurophysiol* 76 (4): 2707–17.
- Andrew RD, MacVicar BA (1994) Imaging Cell Volume Changes and Neuronal Excitation in the Hippocampal Slice. *Neuroscience* 62 (2): 371–83.
- Aragón MC, Agulló L, Giménez C (1988) Depolarization-Induced Release of Glycine and Beta-Alanine from Plasma Membrane Vesicles Derived from Rat Brain Synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* 941 (2): 209–16.
- Baird FE, Beattie KJ, Hyde AR, Ganapathy V, Rennie MJ, Taylor PM (2004) Bidirectional Substrate Fluxes through the System N (SNAT5) Glutamine Transporter May Determine Net Glutamine Flux in Rat Liver. *J Physiol* 559 (2): 367–81.
- Bano D, Nicotera P (2007) Ca²⁺ Signals and Neuronal Death in Brain Ischemia. *Stroke* 38 (2): 674–76.

- Barbour B, Brew H, Attwell D (1988) Electrogenic Glutamate Uptake in Glial Cells Is Activated by Intracellular Potassium. *Nature* 335 (6189): 433–35.
- Barolet AW, Kish SJ, Morris ME (1985) Identification of Extrasynaptic Binding Sites for [3H]GABA in Peripheral Nerve. *Brain Res* 358 (1–2): 104–9.
- Ben-Ari Y (1990) Galanin and Glibenclamide Modulate the Anoxic Release of Glutamate in Rat CA3 Hippocampal Neurons. *Eur J Neurosci* 2 (1): 62–68.
- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH (1984) Elevation of the Extracellular Concentrations of Glutamate and Aspartate in Rat Hippocampus during Transient Cerebral Ischemia Monitored by Intracerebral Microdialysis. *J Neurochem* 43 (5): 1369–74.
- Benveniste H, Jørgensen MB, Sandberg M, Christensen T, Hagberg H, Diemer NH (1989) Ischemic Damage in Hippocampal CA1 Is Dependent on Glutamate Release and Intact Innervation from CA3. *J Cereb Blood Flow Metab* 9 (5): 629–39.
- Bereczki D, Fekete I, Prado GF, Liu M (2007) Mannitol for Acute Stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 18 (3): CD001153
- Bergeron R, Meyer TM, Coyle JT, Greene RW (1998) Modulation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Function by Glycine Transport. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95 (26): 15730–34.
- Bhardwaj A, Ulatowski JA (2004) Hypertonic Saline Solutions in Brain Injury. *Curr Opin Crit Care* 10 (2): 126–31.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A Synaptic Model of Memory: Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Nature* 361 (6407): 31–39.
- Boll M, Foltz M, Anderson CM, Oechsler C, Kottra G, Thwaites DT, Daniel H (2003) Substrate Recognition by the Mammalian Proton-Dependent Amino Acid Transporter PAT1. *Mol Membr Biol* 20 (3): 261–69.
- Borden LA (1996) GABA Transporter Heterogeneity: Pharmacology and Cellular Localization. *Neurochem Int* 29 (4): 335–56.
- Borden LA, Smith KE, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL (1992) Molecular Heterogeneity of the Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Transport System. Cloning of Two Novel High Affinity GABA Transporters from Rat Brain. *J Biol Chem* 267 (29): 21098–104.
- Bosley TM, Woodhams PL, Gordon RD, Balázs R (1983) Effects of Anoxia on the Stimulated Release of Amino Acid Neurotransmitters in the Cerebellum in Vitro. *J Neurochem* 40 (1): 189–201.
- Boulland JL, Osen KK, Levy LM, Danbolt NC, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2002) Cell-Specific Expression of the Glutamine Transporter SN1 Suggests Differences in Dependence on the Glutamine Cycle. *Eur J Neurosci* 15 (10): 1615–31.

- Boulland JL, Rafiki A, Levy LM, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2003) Highly Differential Expression of SN1, a Bidirectional Glutamine Transporter, in Astroglia and Endothelium in the Developing Rat Brain. *Glia* 41 (3): 260–75.
- Bröer A, Albers A, Setiawan I, Edwards RH, Chaudhry FA, Lang F, Wagner CA, Bröer S (2002) “Regulation of the Glutamine Transporter SN1 by Extracellular pH and Intracellular Sodium Ions.” *J Physiol* 539 (Pt 1): 3–14.
- Bröer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner CA, Lang F, Bröer S (1999) “The Astroglial ASCT2 Amino Acid Transporter as a Mediator of Glutamine Efflux.” *J Neurochem* 73 (5): 2184–94.
- Bröer S (2002) Adaptation of Plasma Membrane Amino Acid Transport Mechanisms to Physiological Demands. *Pflugers Arch* 444 (4): 457–66.
- Bröer S, Brookes N (2001) Transfer of Glutamine between Astrocytes and Neurons. *J Neurochem* 77 (3): 705–19.
- Bröer S, Bailey CG, Kowalczyk S, Ng C, Vanslambrouck JM, Rodgers H, Auray-Blais C, Cavanaugh JA, Bröer A, Rasko JE (2008) Iminoglycinuria and Hyperglycinuria Are Discrete Human Phenotypes Resulting from Complex Mutations in Proline and Glycine Transporters. *J Clin Invest* 118 (12): 3881–92.
- Brooks KJ, Kauppinen RA (1993) Calcium-Mediated Damage Following Hypoxia in Cerebral Cortex Ex Vivo Studied by NMR Spectroscopy. Evidence for Direct Involvement of Voltage-Gated Ca(2+)-Channels. *Neurochem Int* 23 (5): 441–50.
- Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, Myseros J, Choi SC, Ward JD, Marmarou A, Young HF (1998) Factors Affecting Excitatory Amino Acid Release Following Severe Human Head Injury. *J Neurosurg* 89 (4): 507–18.
- Bureau MH, Olsen RW (1991) Taurine Acts on a Subclass of GABAA Receptors in Mammalian Brain in Vitro. *Eur J Pharmacol* 207 (1): 9–16.
- Butcher SP, Bullock R, Graham DI, McCulloch J (1990) Correlation between Amino Acid Release and Neuropathologic Outcome in Rat Brain Following Middle Cerebral Artery Occlusion. *Stroke* 21 (12): 1727–33.
- Camacho A, Massieu L (2006) Role of Glutamate Transporters in the Clearance and Release of Glutamate during Ischemia and Its Relation to Neuronal Death. *Arch Med Res* 37 (1): 11–18.
- Chan K, Busque SM, Sailer M, Stoeger C, Bröer S, Daniel H, Rubio-Aliaga I, Wagner CA (2016) Loss of Function Mutation of the Slc38a3 Glutamine Transporter Reveals Its Critical Role for Amino Acid Metabolism in the Liver, Brain, and Kidney. *Pflugers Arch* 468 (2): 213–27.
- Chaudhry FA, Krizaj D, Larsson P, Reimer RJ, Wreden C, Storm-Mathisen J, Copenhagen D, Kavanaugh M, Edwards RH (2001) Coupled and Uncoupled Proton Movement by Amino Acid Transport System N. *EMBO J* 20 (24): 7041–51.

- Chaudhry FA, Schmitz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, Nicoll R, Kavanaugh M, Edwards RH (2002) Glutamine Uptake by Neurons: Interaction of Protons with System a Transporters. *J Neurosci* 22 (1): 62–72.
- Chebabo SR, Hester MA, Aitken PG, Somjen GG (1995a) Hypotonic Exposure Enhances Synaptic Transmission and Triggers Spreading Depression in Rat Hippocampal Tissue Slices. *Brain Res* 695 (2): 203–16.
- Chebabo SR, Hester MA, Jing J, Aitken PG, Somjen GG (1995b) Interstitial Space, Electrical Resistance and Ion Concentrations during Hypotonia of Rat Hippocampal Slices. *J Physiol* 487 (Pt 3) 685–97.
- Chen Z, Fei YJ, Anderson CM, Wake KA, Miyauchi S, Huang W, Thwaites DT, Ganapathy V (2003) Structure, Function and Immunolocalization of a Proton-Coupled Amino Acid Transporter (hPAT1) in the Human Intestinal Cell Line Caco-2. *J Physiol* 546 (Pt 2): 349–61.
- Chen Z, Hu B, Wang F, Du L, Huang B, Li L, Qi J, Wang X (2015) Glycine Bidirectionally Regulates Ischemic Tolerance via Different Mechanisms Including NR2A-Dependent CREB Phosphorylation. *J Neurochem* 133 (3): 397–408.
- Chepkova AN, Doreulee N, Yanovsky Y, Mukhopadhyay D, Haas HL, Sergeeva OA (2002) Long-Lasting Enhancement of Corticostriatal Neurotransmission by Taurine. *Eur J Neurosci* 16 (8): 1523–30.
- Choi DW (1987) Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. *J Neurosci* (2): 369–79.
- Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR (1987) Glutamate Neurotoxicity in Cortical Cell Culture. *J Neurosci* 7 (2): 357–68.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The Role of Glutamate Neurotoxicity in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death. *Annu Rev Neurosci* 13 (1): 171–82.
- Choi IS, Cho JH, Lee MG, Jang IS (2015) Enzymatic Conversion of ATP to Adenosine Contributes to ATP-Induced Inhibition of Glutamate Release in Rat Medullary Dorsal Horn Neurons. *Neuropharmacology* 93 (June): 94–102.
- Clarke PG (1990) Developmental Cell Death: Morphological Diversity and Multiple Mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181 (3): 195–213.
- Clarke PG (1999) Apoptosis Versus Necrosis. En: *Cell Death and Diseases of the Nervous System*, pp3–28. Totowa, NJ: Humana Press.
- Clements JR, Magnusson KR, Beitz AJ (1989) Ultrastructural Description of Taurine-like Immunoreactive Cells and Processes in the Rat Hippocampus. *Synapse* 4 (1): 70–79.
- Cohen SM, Nadler JV (1997) Proline-Induced Potentiation of Glutamate Transmission. *Brain Res* 761 (2): 271–82.
- Colleoni S, Jensen AA, Landucci E, Fumagalli E, Conti P, Pinto A, De Amici M, Pellegrini-Giampietro DE, De Micheli C, Mennini T, Gobbi M (2008). Neuroprotective Effects of the

Novel Glutamate Transporter Inhibitor (–)-3-Hydroxy-4,5,6,6a-Tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-D]-Isoxazole-4-Carboxylic Acid, Which Preferentially Inhibits Reverse Transport (Glutamate Release) Compared with Glutamate Reuptake. *J Pharmacol Exp Ther* 326 (2): 646–56.

Collombet JM, Masqueliez C, Four E, Burckhart MF, Bernabé D, Baubichon D, Lallement G (2006) Early Reduction of NeuN Antigenicity Induced by Soman Poisoning in Mice Can Be Used to Predict Delayed Neuronal Degeneration in the Hippocampus. *Neurosci Lett* 398 (3): 337–42.

Conti F, Zuccarello LV, Barbaresi P, Minelli A, Brecha NC, Melone M (1999) Neuronal, Glial, and Epithelial Localization of Gamma-Aminobutyric Acid Transporter 2, a High-Affinity Gamma-Aminobutyric Acid Plasma Membrane Transporter, in the Cerebral Cortex and Neighboring Structures. *J Comp Neurol* 409 (3): 482–94.

Cubelos B, González-González IM, Giménez C, Zafra F (2005) Amino Acid Transporter SNAT5 Localizes to Glial Cells in the Rat Brain. *Glia* 49 (2): 230–44.

Dale N, Pearson T, Frenguelli BG (2000) Direct Measurement of Adenosine Release during Hypoxia in the CA1 Region of the Rat Hippocampal Slice. *J Physiol* 526 Pt 1 (Julio): 143–55.

Danbolt NC (2001) Glutamate Uptake. *Prog Neurobiol* 65 (1): 1–105.

Darling PB, Lepage G, Leroy C, Masson P, Roy CC (1985) Effect of Taurine Supplements on Fat Absorption in Cystic Fibrosis. *Pediatr Res* 19 (6): 578–82.

Degterev A, Hitomi J, Gernscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J (2008) Identification of RIP1 Kinase as a Specific Cellular Target of Necrostatins. *Nat Chem Biol* 4 (5): 313–21.

Dominy J Jr, Thinschmidt JS, Peris J, Dawson R Jr, Papke RL (2004) Taurine-Induced Long-Lasting Potentiation in the Rat Hippocampus Shows a Partial Dissociation from Total Hippocampal Taurine Content and Independence from Activation of Known Taurine Transporters. *J Neurochem* 89 (5): 1195–1205.

Erecińska M, Nelson D, Nissim I, Daikhin Y, Yudkoff M (1994) Cerebral Alanine Transport and Alanine Aminotransferase Reaction: Alanine as a Source of Neuronal Glutamate. *J Neurochem* 62 (5): 1953–64.

European Stroke Initiative Executive Committee; EUSI Writing Committee, Olsen TS, Langhorne P, Diener HC, Hennerici M, Ferro J, Sivenius J, Wahlgren NG, Bath P (2003) European Stroke Initiative Recommendations for Stroke Management-Update 2003. *Cerebrovasc Dis* 16 (4): 311–37.

Foltz M, Mertl M, Dietz V, Boll M, Kottra G, Daniel H (2005) Kinetics of Bidirectional H⁺ and Substrate Transport by the Proton-Dependent Amino Acid Symporter PAT1. *Biochem J* 386 (Pt 3): 607–16.

- Fotiadis D, Kanai Y, Palacín M (2013) The SLC3 and SLC7 Families of Amino Acid Transporters. *Mol Aspects Med* 34 (2–3): 139–58.
- Franconi F, Bennardini F, Mattana A, Miceli M, Ciuti M, Mian M, Gironi A, Anichini R, Seghieri G (1995) Plasma and Platelet Taurine Are Reduced in Subjects with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Effects of Taurine Supplementation. *Am J Clin Nutr* 61 (5): 1115–19.
- Franconi F, Diana G, Fortuna A, Galletta G, Trombetta G, Valentini G, Seghieri G, Loizzo A (2004) Taurine Administration during Lactation Modifies Hippocampal CA1 Neurotransmission and Behavioural Programming in Adult Male Mice. *Brain Res Bull* 63 (6): 491–97.
- Fuchs SA, Peeters-Scholte CM, de Barse MM, Roeleveld MW, Klomp LW, Berger R, de Koning TJ (2012) Increased Concentrations of Both NMDA Receptor Co-Agonists D-Serine and Glycine in Global Ischemia: A Potential Novel Treatment Target for Perinatal Asphyxia. *Amino Acids* 43 (1): 355–63.
- Fujiwara N, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M (1987) Effects of Hypoxia on Rat Hippocampal Neurones in Vitro. *J Physiol* 384 (March): 131–51.
- Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, Endou H, Kanai Y (2000) Identification and Characterization of a Na(+)-Independent Neutral Amino Acid Transporter That Associates with the 4F2 Heavy Chain and Exhibits Substrate Selectivity for Small Neutral D- and L-Amino Acids. *J Biol Chem* 275 (13): 9690–98.
- Gabernet L, Pauly-Evers M, Schwerdel C, Lentz M, Bluethmann H, Vogt K, Alberati D, Mohler H, Boison D (2005) Enhancement of the NMDA Receptor Function by Reduction of Glycine Transporter-1 Expression. *Neurosci Lett* 373 (1): 79–84.
- Galarreta M, Bustamante J, Martín del Río R, Solís JM (1996) Taurine Induces a Long-Lasting Increase of Synaptic Efficacy and Axon Excitability in the Hippocampus. *J Neurosci* 16 (1): 92–102.
- Galeffi F, Sah R, Pond BB, George A, Schwartz-Bloom RD (2004) Changes in Intracellular Chloride after Oxygen-Glucose Deprivation of the Adult Hippocampal Slice: Effect of Diazepam. *J Neurosci* 24 (18): 4478–88.
- Gliddon CM, Shao Z, LeMaistre JL, Anderson CM (2009) Cellular Distribution of the Neutral Amino Acid Transporter Subtype ASCT2 in Mouse Brain. *J Neurochem* 108 (2): 372–83.
- Goldberg MP, Monyer H, Choi DW (1988) Hypoxic Neuronal Injury in Vitro Depends on Extracellular Glutamine. *Neurosci Lett* 94 (1–2): 52–57.
- González-González IM, Cubelos B, Giménez C, Zafra F (2005) Immunohistochemical Localization of the Amino Acid Transporter SNAT2 in the Rat Brain. *Neuroscience* 130 (1): 61–73.

- Goux E, Lévêillé F, Nicole O, Melon C, Had-Aissouni L, Buisson A (2009) Reverse Glial Glutamate Uptake Triggers Neuronal Cell Death through Extrasynaptic NMDA Receptor Activation. *Mol Cell Neurosci* 40 (4): 463–73.
- Grände PO, Romner B (2012) Osmotherapy in Brain Edema: A Questionable Therapy. *J Neurosurg Anesthesiol* 24 (4): 407–12.
- Grigg JJ, Anderson EG (1989) Glucose and Sulfonylureas Modify Different Phases of the Membrane Potential Change during Hypoxia in Rat Hippocampal Slices. *Brain Res* 489 (2): 302–10.
- Gu S, Roderick HL, Camacho P, Jiang JX (2000) Identification and Characterization of an Amino Acid Transporter Expressed Differentially in Liver. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 97 (7): 3230–35.
- Hackett MJ, Paterson PG, Pickering IJ, George GN (2016) Imaging Taurine in the Central Nervous System Using Chemically Specific X-Ray Fluorescence Imaging at the Sulfur K-Edge. *Anal Chem* 88 (22): 10916–24.
- Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nyström B, Jacobson I, Hamberger A (1985) Ischemia-Induced Shift of Inhibitory and Excitatory Amino Acids from Intra- to Extracellular Compartments. *J Cereb Blood Flow Metab* 5 (3): 413–19.
- Hamdani el H, Gudbrandsen M, Bjørkmo M, Chaudhry FA (2012) The System N Transporter SN2 Doubles as a Transmitter Precursor Furnisher and a Potential Regulator of NMDA Receptors. *Glia* 60 (11): 1671–83.
- Hanretta AT, Lombardini JB (1987) Is Taurine a Hypothalamic Neurotransmitter?: A Model of the Differential Uptake and Compartmentalization of Taurine by Neuronal and Glial Cell Particles from the Rat Hypothalamus. *Brain Res* 434 (2): 167–201.
- Hansen AJ (1985) Effect of Anoxia on Ion Distribution in the Brain. *Physiol Rev* 65 (1): 101–48.
- Haskew-Layton RE, Rudkouskaya A, Jin Y, Feustel PJ, Kimelberg HK, Mongin AA (2008) Two Distinct Modes of Hypoosmotic Medium-Induced Release of Excitatory Amino Acids and Taurine in the Rat Brain In Vivo. *PLoS ONE* 3 (10): e3543.
- HASLEWOOD GA (1955) Recent Developments in Our Knowledge of Bile Salts. *Physiol Rev* 35 (1): 178–96.
- Häusser MA, Yung WH, Lacey MG (1992) Taurine and Glycine Activate the Same Cl-Conductance in Substantia Nigra Dopamine Neurones. *Brain Res* 571 (1): 103–8.
- Helboe L, Egebjerg J, Møller M, Thomsen C (2003) Distribution and Pharmacology of Alanine-Serine-Cysteine Transporter 1 (Asc-1) in Rodent Brain. *Eur J Neurosci* 18 (8): 2227–38.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA (2010) Long-Term Potentiation Depends on Release of D-Serine from Astrocytes. *Nature* 463 (7278): 232–36.

- Hirai H, Okada Y (1993) Serine Released from Hippocampal Slices during Deprivation of Oxygen and Glucose Enhances the Effects of Glutamate on Neuronal Function. *Neuroscience* 54 (1): 61–67.
- Horikoshi T, Asanuma A, Yanagisawa K, Anzai K, Goto S (1988) Taurine and Beta-Alanine Act on Both GABA and Glycine Receptors in *Xenopus* Oocyte Injected with Mouse Brain Messenger RNA. *Brain Res* 464 (2): 97–105.
- Hou ST, MacManus JP (2002) Molecular Mechanisms of Cerebral Ischemia-Induced Neuronal Death. *Int Rev Cytol* 221: 93–148.
- Hsieh CH, Lin YJ, Chen WL, Huang YC, Chang CW, Cheng FC, Liu RS, Shyu WC (2017) HIF-1 α Triggers Long-Lasting Glutamate Excitotoxicity via System xc⁻ in Cerebral Ischaemia-Reperfusion. *J Pathol* 241 (3): 337–49.
- Huang R, Bossut DF, Somjen GG (1997) Enhancement of Whole Cell Synaptic Currents by Low Osmolarity and by Low [NaCl] in Rat Hippocampal Slices. *J Neurophysiol* 77 (5): 2349–59.
- Hutchinson PJ, O'Connell MT, Al-Rawi PG, Kett-White CR, Gupta AK, Maskell LB, Pickard JD, Kirkpatrick PJ (2002) Increases in GABA Concentrations during Cerebral Ischaemia: A Microdialysis Study of Extracellular Amino Acids. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72 (1): 99–105
- Huxtable RJ (1989) Taurine in the Central Nervous System and the Mammalian Actions of Taurine. *Prog Neurobiol* 32 (6): 471–533.
- Huxtable RJ (1992) Physiological Actions of Taurine. *Physiol Rev* 72 (1): 101–63.
- Hyde R, Taylor PM, Hundal HS (2003) Amino Acid Transporters: Roles in Amino Acid Sensing and Signalling in Animal Cells. *Biochem J* 373 (Pt 1): 1–18.
- Hyllienmark L, Brismar T (1999) Effect of Hypoxia on Membrane Potential and Resting Conductance in Rat Hippocampal Neurons. *Neuroscience* 91 (2): 511–17.
- Igartua I, Solís JM, Bustamante J (2007) Glycine-Induced Long-Term Synaptic Potentiation Is Mediated by the Glycine Transporter GLYT1. *Neuropharmacology* 52 (8): 1586–95.
- Ikeda S, Tachikawa M, Akanuma S, Fujinawa J, Hosoya K (2012) Involvement of γ -Aminobutyric Acid Transporter 2 in the Hepatic Uptake of Taurine in Rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303 (3): G291–7.
- Jäger K, Wolf S, Dobrowolny H, Steiner J, Nave H, Maronde E, Bogerts B, Bernstein HG (2013) Differential Topochemistry of Three Cationic Amino Acid Transporter Proteins, hCAT1, hCAT2 and hCAT3, in the Adult Human Brain. *Amino Acids* 44 (2): 423–33.
- Joshi I, Andrew RD (2001) Imaging Anoxic Depolarization during Ischemia-like Conditions in the Mouse Hemi-Brain Slice. *J Neurophysiol* 85 (1): 414–24.
- Kakuda DK, MacLeod CL (1994) Na⁽⁺⁾-Independent Transport (Uniport) of Amino Acids and Glucose in Mammalian Cells. *J Exp Biol* 196 (Noviembre): 93–108.

- Kanner BI, Keynan S, Radian R (1989) Structural and Functional Studies on the Sodium- and Chloride-Coupled Gamma-Aminobutyric Acid Transporter: Deglycosylation and Limited Proteolysis. *Biochemistry* 28 (9): 3722–28.
- Kanthan R, Shuaib A, Griebel R, Miyashita H (1995) Intracerebral Human Microdialysis. In Vivo Study of an Acute Focal Ischemic Model of the Human Brain. *Stroke* 26 (5): 870–73.
- Karnani MM, Apergis-Schoute J, Adamantidis A, Jensen LT, de Lecea L, Fugger L, Burdakov D (2011) Activation of Central Orexin/hypocretin Neurons by Dietary Amino Acids. *Neuron* 72 (4): 616–29.
- Katchman AN, Hershkowitz N (1993) Early Anoxia-Induced Vesicular Glutamate Release Results from Mobilization of Calcium from Intracellular Stores. *J Neurophysiol* 70 (1): 1–7.
- Kavanaugh MP (1993) Voltage Dependence of Facilitated Arginine Flux Mediated by the System Y⁺ Basic Amino Acid Transporter. *Biochemistry* 32 (22): 5781–85.
- Kavanaugh MP, Arriza JL, North RA, Amara SG (1992) Electrogenic Uptake of Gamma-Aminobutyric Acid by a Cloned Transporter Expressed in *Xenopus* Oocytes. *J Biol Chem* 267 (31): 22007–9.
- Kennedy DJ, Gatfield KM, Winpenny JP, Ganapathy V, Thwaites DT (2005) Substrate Specificity and Functional Characterisation of the H⁺/amino Acid Transporter Rat PAT2 (Slc36a2). *Br J Pharmacol* 144 (1): 28–41.
- Kerr DI, Humeniuk RE, Ong J (1994). Gamma-Guanidinobaclofen Is a Peripheral GABAB Receptor Agonist. *Eur J Pharmacol* 262 (1–2): 189–92.
- Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA (1990) Swelling-Induced Release of Glutamate, Aspartate, and Taurine from Astrocyte Cultures. *J Neurosci* 10 (5): 1583–91.
- Kimelberg HK, Macvicar BA, Sontheimer H (2006) Anion Channels in Astrocytes: Biophysics, Pharmacology, and Function. *Glia* 54 (7): 747–57.
- Knapp JM (2005) Hyperosmolar Therapy in the Treatment of Severe Head Injury in Children: Mannitol and Hypertonic Saline. *AACN Clin Issues* 16 (2): 199–211.
- Koizumi H, Fujisawa H, Ito H, Maekawa T, Di X, Bullock R (1997) Effects of Mild Hypothermia on Cerebral Blood Flow-Independent Changes in Cortical Extracellular Levels of Amino Acids Following Contusion Trauma in the Rat. *Brain Res* 747 (2): 304–12.
- Kolbaev S, Draguhn A (2008) Glutamine-Induced Membrane Currents in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Eur J Neurosci* 28 (3): 535–45.
- Kontro P, Oja SS (1978) Taurine Uptake by Rat Brain Synaptosomes. *J Neurochem* 30 (6): 1297–1304.
- Kristensen AS, Andersen J, Jørgensen TN, Sørensen L, Eriksen J, Loland CJ, Strømgaard K, Gether U (2011) SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation. *Pharmacol Rev* 63 (3): 585–640.

- Laidlaw SA1, Kopple JD (1987) Newer Concepts of the Indispensable Amino Acids. *Am J Clin Nutr* 46 (4): 593–605.
- Lau A, Tymianski M (2010) Glutamate Receptors, Neurotoxicity and Neurodegeneration. *Pflugers Arch* 460 (2): 525–42.
- Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, Hartings JA, Graf R, Strong AJ (2011) Clinical Relevance of Cortical Spreading Depression in Neurological Disorders: Migraine, Malignant Stroke, Subarachnoid and Intracranial Hemorrhage, and Traumatic Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metabol* 31 (1): 17–35.
- Lee TS, Bjørnsen LP, Paz C, Kim JH, Spencer SS, Spencer DD, Eid T, de Lanerolle NC (2006) GAT1 and GAT3 Expression Are Differently Localized in the Human Epileptogenic Hippocampus. *Acta Neuropathol* 111 (4): 351–63.
- Lehre KP1, Danbolt NC (1998) The Number of Glutamate Transporter Subtype Molecules at Glutamatergic Synapses: Chemical and Stereological Quantification in Young Adult Rat Brain. *J Neurosci* 18 (21): 8751–57.
- Lerma J, Herranz AS, Herreras O, Abaira V, Martín del Río R (1986) In Vivo Determination of Extracellular Concentration of Amino Acids in the Rat Hippocampus. A Method Based on Brain Dialysis and Computerized Analysis. *Brain Res* 384 (1): 145–55.
- Li H, Zhang N, Lin HY, Yu Y, Cai QY, Ma L, Ding S. (2014) Histological, Cellular and Behavioral Assessments of Stroke Outcomes after Photothrombosis-Induced Ischemia in Adult Mice. *BMC Neurosci* 15 (1): 58.
- Liu QR1, López-Corcuera B, Nelson H, Mandiyan S, Nelson N (1992) Cloning and Expression of a cDNA Encoding the Transporter of Taurine and Beta-Alanine in Mouse Brain. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 89 (24): 12145–49.
- Liu QR, López-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N. (1993) Molecular Characterization of Four Pharmacologically Distinct Gamma-Aminobutyric Acid Transporters in Mouse Brain [Corrected]. *J Biol Chem* 268 (3): 2106–12.
- Liu S, Wang Y, Worley PF, Mattson MP, Gaiano N (2015) The Canonical Notch Pathway Effector RBP-J Regulates Neuronal Plasticity and Expression of GABA Transporters in Hippocampal Networks. *Hippocampus* 25 (5): 670–78.
- Lombardini JB (1985) Effects of Taurine on Calcium Ion Uptake and Protein Phosphorylation in Rat Retinal Membrane Preparations. *J Neurochem* 45 (1): 268–75.
- Maallem S, Mutin M, González-González IM, Zafra F, Tappaz ML (2008) Selective Tonicity-Induced Expression of the Neutral Amino-Acid Transporter SNAT2 in Oligodendrocytes in Rat Brain Following Systemic Hypertonicity. *Neuroscience* 153 (1): 95–107.
- Maas AI, Dearden M, Teasdale GM, Braakman R, Cohadon F, Iannotti F, Karimi A, Lapierre F, Murray G, Ohman J, Persson L, Servadei F, Stocchetti N, Unterberg A (1997) EBIC-

- Guidelines for Management of Severe Head Injury in Adults. European Brain Injury Consortium. *Acta Neurochir* 139 (4): 286–94.
- MacGregor DG, Avshalumov MV, Rice ME (2003) Brain Edema Induced by in Vitro Ischemia: Causal Factors and Neuroprotection. *J Neurochem* 85 (6): 1402–11.
- Mackenzie B, Erickson JD (2004) Sodium-Coupled Neutral Amino Acid (System N/A) Transporters of the SLC38 Gene Family. *Pflugers Arch* 447 (5): 784–95.
- Madl JE, Burgesser K (1993) Adenosine Triphosphate Depletion Reverses Sodium-Dependent, Neuronal Uptake of Glutamate in Rat Hippocampal Slices. *J Neurosci* 13 (10): 4429–44.
- Malarkey EB, Parpura V (2008) Mechanisms of Glutamate Release from Astrocytes. *Neurochem Int* 52 (1–2): 142–54.
- Massie A, Boillée S, Hewett S, Knackstedt L, Lewerenz J (2015) Main path and byways: non-vesicular glutamate release by system xc(-) as an important modifier of glutamatergic neurotransmission. *J Neurochem* 135 (6): 1062–79.
- Matsumoto K, Lo EH, Pierce AR, Halpern EF, Newcomb R (1996) Secondary Elevation of Extracellular Neurotransmitter Amino Acids in the Reperfusion Phase Following Focal Cerebral Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 (1): 114–24.
- McCool BA, Farroni J (2001) A 1 Adenosine Receptors Inhibit Multiple Voltage-Gated Ca²⁺ Channel Subtypes in Acutely Isolated Rat Basolateral Amygdala Neurons. *Br J Pharmacol* 132 (4): 879–88.
- Melone M, Ciappelloni S, Conti F (2015) A Quantitative Analysis of Cellular and Synaptic Localization of GAT-1 and GAT-3 in Rat Neocortex. *Brain Struct Funct* 220 (2): 885–97.
- Melone M, Quagliano F, Barbaresi P, Varoqui H, Erickson JD, Conti F (2004) Localization of the Glutamine Transporter SNAT1 in Rat Cerebral Cortex and Neighboring Structures, with a Note on Its Localization in Human Cortex. *Cereb Cortex* 14 (5): 562–74.
- Meloni BP, Meade AJ, Kitikomolsuk D, Knuckey NW (2011) Characterisation of Neuronal Cell Death in Acute and Delayed in Vitro Ischemia (Oxygen?glucose Deprivation) Models. *J Neurosci Methods* 195 (1): 67–74.
- de Mendonça A, Sebastião AM, Ribeiro JA (1995) Inhibition of NMDA Receptor-Mediated Currents in Isolated Rat Hippocampal Neurones by Adenosine A1 Receptor Activation. *Neuroreport* 6 (8): 1097–1100.
- Mennel HD, Müller I (1994) Morphometric Investigation on Nuclear and Nucleolar Arrangement and AgNOR Content in the Rat Hippocampus under Normal and Ischemic Conditions. *Exp Toxicol Pathol* 46 (6): 491–501.
- Metzner L, Dorn M, Markwardt F, Brandsch M (2009) The Orally Active Antihyperglycemic Drug Beta-Guanidinopropionic Acid Is Transported by the Human Proton-Coupled Amino Acid Transporter hPAT1. *Mol Pharma* 6 (3): 1006–11.

- Metzner L, Kalbitz J, Brandsch M (2004) Transport of Pharmacologically Active Proline Derivatives by the Human Proton-Coupled Amino Acid Transporter hPAT1. *J Pharmacol Exp Ther* 309 (1): 28–35.
- Metzner L, Neubert K, Brandsch M (2006) Substrate Specificity of the Amino Acid Transporter PAT1. *Amino Acids* 31 (2): 111–17.
- Militante JD, Lombardini JB (2002) Treatment of Hypertension with Oral Taurine: Experimental and Clinical Studies. *Amino Acids* 23 (4): 381–93.
- Mitani A, Tanaka K (2003) Functional Changes of Glial Glutamate Transporter GLT-1 during Ischemia: An in Vivo Study in the Hippocampal CA1 of Normal Mice and Mutant Mice Lacking GLT-1. *J Neurosci* 23 (18): 7176–82.
- Molz S, Tharine DC, Decker H, Tasca CI (2008) GMP Prevents Excitotoxicity Mediated by NMDA Receptor Activation but Not by Reversal Activity of Glutamate Transporters in Rat Hippocampal Slices. *Brain Res* 1231 (Septiembre): 113–20.
- Morris ME, Di Costanzo GA, Fox S, Werman R (1983) Depolarizing Action of GABA (Gamma-Aminobutyric Acid) on Myelinated Fibers of Peripheral Nerves. *Brain Res* 278 (1–2): 117–26.
- Mukandala G, Tynan R, Lanigan S, O'Connor JJ (2016) The Effects of Hypoxia and Inflammation on Synaptic Signaling in the CNS. *Brain Sci* 6 (1): 6.
- Müller M (2000) Effects of Chloride Transport Inhibition and Chloride Substitution on Neuron Function and on Hypoxic Spreading-Depression-like Depolarization in Rat Hippocampal Slices. *Neuroscience* 97 (1): 33–45.
- Musleh W, Bi X, Tocco G, Yaghoubi S, Baudry M (1997) Glycine-Induced Long-Term Potentiation Is Associated with Structural and Functional Modifications of Alpha-Amino-3-Hydroxyl-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptors. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 94 (17): 9451–56.
- Mustafa AK, Ahmad AS, Zeynalov E, Gazi SK, Sikka G, Ehmsen JT, Barrow RK, Coyle JT, Snyder SH, Doré S (2010) Serine Racemase Deletion Protects Against Cerebral Ischemia and Excitotoxicity. *J Neurosci* 30 (4): 1413–16.
- Nakagawa T, Kaneko S (2013) SLC1 Glutamate Transporters and Diseases: Psychiatric Diseases and Pathological Pain. *Curr Mol Pharmacol* 6 (2): 66–73.
- Nakajima R, Nakamura T, Ogawa M, Miyakawa H, Kudo Y (2004) Novel Method for Quantification of Brain Cell Swelling in Rat Hippocampal Slices. *J Neurosci Res* 76 (5): 723–33.
- Nakanishi T, Sugawara M, Huang W, Martindale RG, Leibach FH, Ganapathy ME, Prasad PD, Ganapathy V (2001) Structure, Function, and Tissue Expression Pattern of Human SN2, a Subtype of the Amino Acid Transport System N. *Biochem Biophys Res Commun* 281 (5): 1343–48.

- Nakauchi J, Matsuo H, Kim DK, Goto A, Chairoungdua A, Cha SH, Inatomi J, Shiokawa Y, Yamaguchi K, Saito I, Endou H, Kanai Y (2000) Cloning and Characterization of a Human Brain Na(+)-Independent Transporter for Small Neutral Amino Acids That Transports D-Serine with High Affinity. *Neurosci Lett* 287 (3): 231–35.
- Nelson D, Cox M (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Newell DW, Barth A, Ricciardi TN, Malouf AT (1997) Glycine Causes Increased Excitability and Neurotoxicity by Activation of NMDA Receptors in the Hippocampus. *Exp Neurol* 145 (1): 235–44.
- Nicholls D, Attwell D (1990) “The Release and Uptake of Excitatory Amino Acids. *Trends Pharmacol Sci* 11 (11): 462–68.
- Nicholson C, Chen KC, Hrabětová S, Tao L (2000) Diffusion of Molecules in Brain Extracellular Space: Theory and Experiment. *Prog Brain Res* 125: 129–54.
- Nishimura F, Nishihara M, Mori M, Torii K, Takahashi M (1995) Excitability of Neurons in the Ventromedial Nucleus in Rat Hypothalamic Slices: Modulation by Amino Acids at Cerebrospinal Fluid Levels. *Brain Res* 691 (1–2): 217–22.
- Nishimura T, Yagi R, Usuda M, Oda K, Yamazaki M, Suda S, Takahashi Y, Okazaki F, Sai Y, Higuchi K, Maruyama T, Tomi M, Nakashima E (2014) System A Amino Acid Transporter SNAT2 Shows Subtype-Specific Affinity for Betaine and Hyperosmotic Inducibility in Placental Trophoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1838 (5): 1306–12.
- Oja SS, Saransaari P (2012) Taurine and Neurotransmission. In: *Taurine in Health and Disease* (Transworld Research Network, ed), pp191–214. Kerala, India.
- del Olmo N, Bustamante J, del Río RM, Solís JM (2000) Taurine Activates GABA(A) but Not GABA(B) Receptors in Rat Hippocampal CA1 Area. *Brain Res* 864 (2): 298–307.
- del Olmo N, Galarreta M, Bustamante J, Martín del Río R, Solís JM (2000) Taurine-Induced Synaptic Potentiation: Role of Calcium and Interaction with LTP. *Neuropharmacology* 39 (1): 40–54.
- del Olmo N1, Handler A, Alvarez L, Bustamante J, Martín del Río R, Solís JM (2003) Taurine-Induced Synaptic Potentiation and the Late Phase of Long-Term Potentiation Are Related Mechanistically. *Neuropharmacology* 44 (1): 26–39.
- del Olmo N, Suárez LM, Orensanz LM, Suárez F, Bustamante J, Duarte JM, Martín del Río R, Solís JM (2004) Role of Taurine Uptake on the Induction of Long-Term Synaptic Potentiation. *Eur J Neurosci* 19 (7): 1875–86.
- Østergaard L, Aamand R, Karabegovic S, Tietze A, Blicher JU, Mikkelsen IK, Iversen NK, Secher N, Engedal TS, Anzabi M, Jimenez EG, Cai C, Koch KU, Naess-Schmidt ET, Obel A, Juul N, Rasmussen M, Sørensen JC (2013) The Role of the Microcirculation in Delayed Cerebral

- Ischemia and Chronic Degenerative Changes after Subarachnoid Hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 33 (12): 1825–37.
- Paauw JD, Davis AT (1990) Taurine Concentrations in Serum of Critically Injured Patients and Age- and Sex-Matched Healthy Control Subjects. *Am J Clin Nutr* 52 (4): 657–60.
- Pace JR, Martin BM, Paul SM, Rogawski MA (1992) High Concentrations of Neutral Amino Acids Activate NMDA Receptor Currents in Rat Hippocampal Neurons. *Neurosci Lett* 141 (1): 97–100.
- Palacín M, Estévez R, Bertran J, Zorzano A (1998) Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters. *Physiol Rev* 78 (4): 969–1054.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005) Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* 310 (5745): 113–16.
- Pedata F, Latini S, Pugliese AM, Pepeu G (1993) Investigations into the Adenosine Outflow from Hippocampal Slices Evoked by Ischemia-like Conditions. *J Neurochem* 61 (1): 284–89.
- Pingitore P, Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Hedfalk K, Indiveri C (2013) Large Scale Production of the Active Human ASCT2 (SLC1A5) Transporter in *Pichia Pastoris*--Functional and Kinetic Asymmetry Revealed in Proteoliposomes. *Biochim Biophys Acta* 1828 (9): 2238–46.
- Pisani A, Calabresi P, Tozzi A, D'Angelo V, Bernardi G (1998) L-Type Ca²⁺ Channel Blockers Attenuate Electrical Changes and Ca²⁺ Rise Induced by Oxygen/glucose Deprivation in Cortical Neurons. *Stroke* 29 (1): 196–201; discussion 202.
- Platt B, Withington DJ (1998) GABA-Induced Long-Term Potentiation in the Guinea-Pig Superior Colliculus. *Neuropharmacology* 37 (9): 1111–22.
- Platt B, Bate JR, von Linstow Roloff E, Withington DJ (1998) Glycine Induces a Novel Form of Long-Term Potentiation in the Superficial Layers of the Superior Colliculus. *Br J Pharmacol* 125 (2): 293–300.
- Pow DV, Sullivan R, Reye P, Hermanussen S (2002) Localization of Taurine Transporters, Taurine, and (3)H Taurine Accumulation in the Rat Retina, Pituitary, and Brain. *Glia* 37 (2): 153–68.
- Prentice H, Modi JP, Wu JY (2015) Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2015. Hindawi Publishing Corporation: 964518.
- Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, Pascual-Garvi JM, Matías-Guiú J, Roda JM, Barcia-Albacar JA (2008) [Experimental Models of Cerebral Ischemia]. *Rev Neurol* 47 (8): 414–26.

- Puyal J, Ginet V, Clarke PG (2013) Multiple Interacting Cell Death Mechanisms in the Mediation of Excitotoxicity and Ischemic Brain Damage: A Challenge for Neuroprotection. *Prog Neurobiol* 105 (Junio): 24–48.
- Rae C, Hare N, Bubb WA, McEwan SR, Bröer A, McQuillan JA, Balcar VJ, Conigrave AD, Bröer S (2003) Inhibition of Glutamine Transport Depletes Glutamate and GABA Neurotransmitter Pools: Further Evidence for Metabolic Compartmentation. *J Neurochem* 85 (2): 503–14.
- Ramamoorthy S, Leibach FH, Mahesh VB, Han H, Yang-Feng T, Blakely RD, Ganapathy V (1994) Functional Characterization and Chromosomal Localization of a Cloned Taurine Transporter from Human Placenta. *Biochem J*, 893–900.
- Rang HP, Ritchie JM (1968) On the Electrogenic Sodium Pump in Mammalian Non-Myelinated Nerve Fibres and Its Activation by Various External Cations. *J Physiol* 196 (1): 183–221.
- Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ (2001) Antisense Knockdown of the Glial Glutamate Transporter GLT-1, but Not the Neuronal Glutamate Transporter EAAC1, Exacerbates Transient Focal Cerebral Ischemia-Induced Neuronal Damage in Rat Brain. *J Neurosci* 21 (6): 1876–83.
- Ribak CE, Tong WM, Brecha NC (1996) GABA Plasma Membrane Transporters, GAT-1 and GAT-3, Display Different Distributions in the Rat Hippocampus. *J Comp Neurol* 367 (4): 595–606.
- Ribeiro CS, Reis M, Panizzutti R, de Miranda J, Wolosker H (2002) Glial Transport of the Neuromodulator D-Serine. *Brain Res* 929 (2): 202–9.
- Ripps H, Shen W (2012) Review: taurine: a "very essential" amino acid. *Mol Vis* 18: 2673–86.
- Rodríguez A, Ortega A, Berumen LC, García-Alcocer MG, Giménez C, Zafra F (2014) Expression of the System N Transporter (SNAT5/SN2) during Development Indicates Its Plausible Role in Glutamatergic Neurotransmission. *Neurochem Int* 73 (Julio): 166–71.
- Rosenberg D, Artoul S, Segal AC, Kolodney G, Radzishevsky I, Dikopoltsev E, Foltyn VN, Inoue R, Mori H, Billard JM, Wolosker H (2013) Neuronal D-Serine and Glycine Release Via the Asc-1 Transporter Regulates NMDA Receptor-Dependent Synaptic Activity. *J Neurosci* 33 (8): 3533–44.
- Rosenberg PA, Aizenman E (1989). Hundred-Fold Increase in Neuronal Vulnerability to Glutamate Toxicity in Astrocyte-Poor Cultures of Rat Cerebral Cortex. *Neurosci Lett* 103 (2): 162–68.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate Release in Severe Brain Ischaemia Is Mainly by Reversed Uptake. *Nature* 403 (6767): 316–21.
- Rothman S (1984) Synaptic Release of Excitatory Amino Acid Neurotransmitter Mediates Anoxic Neuronal Death. *J Neurosci* 4 (7): 1884–91.
- Rothman S (1985) The Neurotoxicity of Excitatory Amino Acids Is Produced by Passive Chloride Influx. *J Neurosci* (6): 1483–89.

- Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the Pathophysiology of Hypoxic--Ischemic Brain Damage. *Ann Neurol* 19 (2): 105–11.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate. *Neuron* 16 (3): 675–86.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB (2005) Beta-Lactam Antibiotics Offer Neuroprotection by Increasing Glutamate Transporter Expression. *Nature* 433 (7021): 73–77.
- Rubio-Aliaga I, Boll M, Vogt Weisenhorn DM, Foltz M, Kottra G, Daniel H (2004) The Proton/amino Acid Cotransporter PAT2 Is Expressed in Neurons with a Different Subcellular Localization than Its Paralog PAT1. *J Biol Chem* 279 (4): 2754–60.
- Sajikumar S, Navakkode S, Frey JU (2005) Protein Synthesis-Dependent Long-Term Functional Plasticity: Methods and Techniques. *Curr Opin Neurobiol* 15 (5): 607–13.
- Sánchez-Prieto J, González P (1988) Occurrence of a Large Ca²⁺-Independent Release of Glutamate during Anoxia in Isolated Nerve Terminals (Synaptosomes). *J Neurochem* 50 (4): 1322–24.
- Saransaari P, Oja SS (2008) Taurine in Neurotransmission: En Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, 325–42. Boston, MA: Springer US.
- Scalise M, Pochini L, Pingitore P, Hedfalk K, Indiveri C (2015) Cysteine Is Not a Substrate but a Specific Modulator of Human ASCT2 (SLC1A5) Transporter. *FEBS Lett* 589 (23): 3617–23.
- Schaffer SW1, Jong CJ, Ito T, Azuma J (2014) Effect of Taurine on Ischemia–reperfusion Injury. *Amino Acids* 46 (1): 21–30.
- Schousboe A, Hertz L (1981) Role of Astroglial Cells in Glutamate Homeostasis. *Adv Biochem Psychopharmacol* 27: 103–13.
- Sebastião AM, de Mendonca A, Moreira T, Ribeiro JA (2001) Activation of Synaptic NMDA Receptors by Action Potential-Dependent Release of Transmitter during Hypoxia Impairs Recovery of Synaptic Transmission on Reoxygenation. *J Neurosci* 21 (21): 8564–71.
- Sebring LA, Huxtable RJ (1986) Low Affinity Binding of Taurine to Phospholiposomes and Cardiac Sarcolemma. *Biochim Biophys Acta* 884 (3): 559–66.
- Sergeeva OA, Chepkova AN, Doreulee N, Eriksson KS, Poelchen W, Mönnighoff I, Heller-Stilb B, Warskulat U, Häussinger D, Haas HL (2003) Taurine-Induced Long-Lasting Enhancement of Synaptic Transmission in Mice: Role of Transporters. *J Physiol* 550 (3): 911–19.
- Sergeeva OA, Haas HL (2001) Expression and Function of Glycine Receptors in Striatal Cholinergic Interneurons from Rat and Mouse. *Neuroscience* 104 (4): 1043–55.

- Shahi K, Baudry M (1993) Glycine-Induced Changes in Synaptic Efficacy in Hippocampal Slices Involve Changes in AMPA Receptors. *Brain Res* 627 (2): 261–66.
- Shank RP, Aprison MH (1981) Present Status and Significance of the Glutamine Cycle in Neural Tissues. *Life Sci* 28 (8): 837–42.
- Shimada N, Graf R, Rosner G, Heiss WD (1990) Differences in Ischemia-Induced Accumulation of Amino Acids in the Cat Cortex. *Stroke* 21 (10): 1445–51.
- Shimada N, Graf R, Rosner G, Heiss WD (1993) Ischemia-Induced Accumulation of Extracellular Amino Acids in Cerebral Cortex, White Matter, and Cerebrospinal Fluid. *J Neurochem* 60 (1): 66–71.
- Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS (1984) Blockade of N-Methyl-D-Aspartate Receptors May Protect against Ischemic Damage in the Brain. *Science* 226 (4676): 850–52.
- Skrede KK, Westgaard RH (1971) The Transverse Hippocampal Slice: A Well-Defined Cortical Structure Maintained in Vitro. *Brain Res* 35 (2): 589–93.
- Smith KE, Borden LA, Wang CH, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL (1992) Cloning and Expression of a High Affinity Taurine Transporter from Rat Brain. *Mol Pharmacol* 42 (4): 563–69.
- Solís JM, Herranz AS, Herreras O, Lerma J, Martín del Río R (1988) Does Taurine Act as an Osmoregulatory Substance in the Rat Brain? *Neurosci Lett* 91 (1): 53–58.
- Somjen GG (2001) Mechanisms of Spreading Depression and Hypoxic Spreading Depression-like Depolarization. *Physiol Rev* 81 (3): 1065–96.
- Song NY, Shi HB, Li CY, Yin SK (2012) Interaction between Taurine and GABAA/glycine Receptors in Neurons of the Rat Anteroventral Cochlear Nucleus. *Brain Res* 1472 (Septiembre): 1–10.
- Soria FN, Pérez-Samartín A, Martín A, Gona KB, Llop J, Szczupak B, Chara JC, Matute C, Domercq M (2014) Extrasynaptic Glutamate Release through Cystine/glutamate Antiporter Contributes to Ischemic Damage. *J Clin Invest* 124 (8): 3645–55.
- Steffensen AB, Sword J, Croom D, Kirov SA, MacAulay N (2015) Chloride Cotransporters as a Molecular Mechanism Underlying Spreading Depolarization-Induced Dendritic Beading. *J Neurosci* 35 (35): 12172–87.
- Strange K (1993) Maintenance of Cell Volume in the Central Nervous System. *Pediatr Nephrol* 7 (5): 689–97.
- Sturman JA (1993) Taurine in Development. *Physiol Rev* 73 (1): 119–47.
- Suárez LM, Bustamante J, Orensanz LM, Martín del Río R, Solís JM (2014) Cooperation of Taurine Uptake and Dopamine D1 Receptor Activation Facilitates the Induction of Protein Synthesis-Dependent Late LTP. *Neuropharmacology* 79: 101–11.

- Suárez LM, Muñoz MD, González JC, Bustamante J, Del Río RM, Solís JM (2016) The Taurine Transporter Substrate Guanidinoethyl Sulfonate Mimics the Action of Taurine on Long-Term Synaptic Potentiation. *Amino Acids* 48 (11): 2647–56.
- Suárez LM, Solís JM (2006) Taurine Potentiates Presynaptic NMDA Receptors in Hippocampal Schaffer Collateral Axons. *Eur J Neurosci* 24 (2): 405–18.
- Suárez LM, Suárez F, Del Olmo N, Ruiz M, González-Escalada JR, Solís JM (2005) Presynaptic NMDA Autoreceptors Facilitate Axon Excitability: A New Molecular Target for the Anticonvulsant Gabapentin. *Eur J Neurosci* 21 (1): 197–209.
- Szatkowski M, Barbour B, Attwell D (1990) Non-Vesicular Release of Glutamate from Glial Cells by Reversed Electrogenic Glutamate Uptake. *Nature* 348 (6300): 443–46.
- Taber KH, Lin CT, Liu JW, Thalmann RH, Wu JY (1986) Taurine in Hippocampus: Localization and Postsynaptic Action. *Brain Res* 386 (1–2): 113–21.
- Tanaka E, Yamamoto S, Inokuchi H, Isagai T, Higashi H (1999) Membrane Dysfunction Induced by in Vitro Ischemia in Rat Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *J Neurophysiol* 81 (4): 1872–80.
- Tanaka E, Yamamoto S, Kudo Y, Mihara S, Higashi H (1997) Mechanisms Underlying the Rapid Depolarization Produced by Deprivation of Oxygen and Glucose in Rat Hippocampal CA1 Neurons in Vitro. *J Neurophysiol* 78 (2): 891–902.
- Tanaka E, Yasumoto S, Hattori G, Niiyama S, Matsuyama S, Higashi H (2001) Mechanisms Underlying the Depression of Evoked Fast EPSCs Following in Vitro Ischemia in Rat Hippocampal CA1 Neurons. *J Neurophysiol* 86 (3): 1095–1103.
- Tappaz ML (2004) Taurine Biosynthetic Enzymes and Taurine Transporter: Molecular Identification and Regulations. *Neurochem Res* 29 (1): 83–96.
- Thompson SM, Haas HL, Gähwiler BH (1992) Comparison of the Actions of Adenosine at Pre- and Postsynaptic Receptors in the Rat Hippocampus in Vitro. *J Physiol* 451: 347–63.
- Thondorf I, Voigt V, Schäfer S, Gebauer S, Zebisch K, Laug L, Brandsch M (2011) Three-Dimensional Quantitative Structure–activity Relationship Analyses of Substrates of the Human Proton-Coupled Amino Acid Transporter 1 (hPAT1). *Bioorg Med Chem* 19 (21): 6409–18.
- Todd AC, Marx MC, Hulme SR, Bröer S, Billups B (2017) SNAT3-Mediated Glutamine Transport in Perisynaptic Astrocytes in Situ Is Regulated by Intracellular Sodium. *Glia* 65 (6): 900–916.
- Tomi M, Tajima A, Tachikawa M, Hosoya K (2008) Function of Taurine Transporter (Slc6a6/TauT) as a GABA Transporting Protein and Its Relevance to GABA Transport in Rat Retinal Capillary Endothelial Cells. *Biochim Biophys Acta* 1778 (10): 2138–42.

- Tomimoto H, Yanagihara T (1992) Immunoelectron Microscopic Study of Tubulin and Microtubule-Associated Proteins after Transient Cerebral Ischemia in Gerbils. *Acta Neuropathol* 84 (4): 394–99.
- Torres-Zamorano V, Leibach FH, Ganapathy V (1998) Sodium-Dependent Homo- and Hetero-Exchange of Neutral Amino Acids Mediated by the Amino Acid Transporter ATB Degree. *Biochem Biophys Res Commun* 245 (3): 824–29.
- Traynelis SF, Dingledine R (1989) Modification of Potassium-Induced Interictal Bursts and Electrographic Seizures by Divalent Cations. *Neurosci Lett* 98 (2): 194–99.
- Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH (1993) Source Specificity of Early Calcium Neurotoxicity in Cultured Embryonic Spinal Neurons. *J Neurosci* 13 (5): 2085–2104.
- Uchida S, Kwon HM, Yamauchi A, Preston AS, Marumo F, Handler JS (1992) Molecular Cloning of the cDNA for an MDCK Cell Na(+)- and Cl(-)-Dependent Taurine Transporter That Is Regulated by Hypertonicity. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 89 (17): 8230–34.
- Uematsu D, Greenberg JH, Hickey WF, Reivich M (1989) Nimodipine Attenuates Both Increase in Cytosolic Free Calcium and Histologic Damage Following Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion in Cats. *Stroke* 20 (11): 1531-7.
- Unal-Cevik I, Kiliç M, Gürsoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T (2004) Loss of NeuN Immunoreactivity after Cerebral Ischemia Does Not Indicate Neuronal Cell Loss: A Cautionary Note. *Brain Res* 1015 (1–2): 169–74.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y (1996) Cloning and Functional Characterization of a System ASC-like Na⁺-Dependent Neutral Amino Acid Transporter. *J Biol Chem* 271 (25): 14883–90.
- Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y (2004) CATs and HATs: The SLC7 Family of Amino Acid Transporters. *Pflugers Arch* 447 (5): 532–42.
- Wallis RA, Panizzon KL, Nolan JP (1995) Glycine-Induced CA1 Excitotoxicity in the Rat Hippocampal Slice. *Brain Res* 685 (1–2): 115–25.
- Wang J, Zhang K, Chen X, Liu X, Teng H, Zhao M, Sun Z (2017) Epigenetic Activation of ASCT2 in the Hippocampus Contributes to Depression-Like Behavior by Regulating D-Serine in Mice. *Front Mol Neurosci* 10 (Mayo): 139.
- Watanabe Y, Himi T, Saito H, Abe K (1992) Involvement of Glycine Site Associated with the NMDA Receptor in Hippocampal Long-Term Potentiation and Acquisition of Spatial Memory in Rats. *Brain Res* 582 (1): 58–64.
- Westergren I, Nyström B, Hamberger A, Nordborg C, Johansson BB (1994) Concentrations of Amino Acids in Extracellular Fluid after Opening of the Blood-Brain Barrier by Intracarotid Infusion of Protamine Sulfate. *J Neurochem* 62 (1): 159–65.
- White AM, Platt B (2001) Ionic Mechanisms of GABA-Induced Long-Term Potentiation in the Rat Superior Colliculus. *Exp Brain Res* 140 (4): 486–94.

- Winfree CJ, Baker CJ, Connolly ES Jr, Fiore AJ, Solomon RA (1996) Mild Hypothermia Reduces Penumbral Glutamate Levels in the Rat Permanent Focal Cerebral Ischemia Model. *Neurosurgery* 38 (6): 1216–22.
- Wójcik OP, Koenig KL, Zeleniuch-Jacquotte A, Costa M, Chen Y (2010) The Potential Protective Effects of Taurine on Coronary Heart Disease. *Atherosclerosis* 208 (1): 19–25.
- Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL (1986) The Anticonvulsant MK-801 Is a Potent N-Methyl-D-Aspartate Antagonist. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 83 (18): 7104–8.
- Wreden CC1, Johnson J, Tran C, Seal RP, Copenhagen DR, Reimer RJ, Edwards RH (2003) The H⁺-Coupled Electrogenic Lysosomal Amino Acid Transporter LYAAT1 Localizes to the Axon and Plasma Membrane of Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 23 (4): 1265–75.
- Wroge CM, Hogins J, Eisenman L, Mennerick S (2012) Synaptic NMDA Receptors Mediate Hypoxic Excitotoxic Death. *J Neurosci* 32 (19): 6732–42.
- Wu ZY, Xu TL (2003) Taurine-Evoked Chloride Current and Its Potentiation by Intracellular Ca²⁺ in Immature Rat Hippocampal CA1 Neurons. *Amino Acids* 24 (1–2): 155–61.
- Xu ZC, Pulsinelli WA (1994) Responses of CA1 Pyramidal Neurons in Rat Hippocampus to Transient Forebrain Ischemia: An in Vivo Intracellular Recording Study. *Neurosci Lett* 171 (1–2): 187–91.
- Yamamoto K, Akai F, Yoshimine T, Yanagihara T (1987) Immunohistochemical Investigation of Cerebral Ischemia after Middle Cerebral Artery Occlusion in Gerbils. *J Neurosurg* 67 (3): 414–20.
- Yamashiro K, Fujii Y, Maekawa S, Morita M (2017) Multiple Pathways for Elevating Extracellular Adenosine in the Rat Hippocampal CA1 Region Characterized by Adenosine Sensor Cells. *J Neurochem* 140 (1): 24–36.
- Yanagihara T, Yoshimine T, Morimoto K, Yamamoto K, Homburger HA (1985) Immunohistochemical Investigation of Cerebral Ischemia in Gerbils. *J Neuropathol Exp Neurol* 44 (2): 204–15.
- Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S (2003) Contribution of Astrocytes to Hippocampal Long-Term Potentiation through Release of D-Serine. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 100 (25): 15194–99.
- Yao D, Mackenzie B, Ming H, Varoqui H, Zhu H, Hediger MA, Erickson JD (2000) A Novel System A Isoform Mediating Na⁺/neutral Amino Acid Cotransport. *J Biol Chem* 275 (30): 22790–97.
- Yao H, Shu Y, Wang J, Brinkman BC, Haddad GG (2007) Factors Influencing Cell Fate in the Infarct Rim. *J Neurochem* 100 (5): 1224–33.

- Ye H1, Jalini S, Zhang L, Charlton M, Carlen PL (2010) Early Ischemia Enhances Action Potential-Dependent, Spontaneous Glutamatergic Responses in CA1 Neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 30 (3): 555–65.
- Yoshimine T, Morimoto K, Brengman JM, Homburger HA, Mogami H, Yanagihara T (1985) Immunohistochemical Investigation of Cerebral Ischemia during Recirculation. *J Neurosurg* 63 (6): 922–28.
- Yu K, Yu SS, Ruan DY (2005) Opposite Effects of Lead Exposure on Taurine- and HFS-Induced LTP in Rat Hippocampus. *Brain Res Bull* 64 (6): 525–31.
- Zafra F, Aragón C, Giménez C (1997) Molecular Biology of Glycinergic Neurotransmission. *Mol Neurobiol* 14 (3): 117–42.
- Zerangue N, Kavanaugh MP (1996) Flux Coupling in a Neuronal Glutamate Transporter. *Nature* 383 (6601): 634–37.
- Zhou X, Hollern D, Liao J, Andrechek E, Wang H (2013) NMDA Receptor-Mediated Excitotoxicity Depends on the Coactivation of Synaptic and Extrasynaptic Receptors. *Cell Death Dis* 4 (3): e560.
- Zhou Y, Danbolt NC (2013) GABA and Glutamate Transporters in Brain. *FrontEndocrinol* 4: 165.
- Zhou Y, Holmseth S, Guo C, Hassel B, Höfner G, Huitfeldt HS, Wanner KT, Danbolt NC (2012) Deletion of the γ -Aminobutyric Acid Transporter 2 (GAT2 and SLC6A13) Gene in Mice Leads to Changes in Liver and Brain Taurine Contents. *J Biol Chem* 287 (42): 35733–46.
- Zucker RS (1989) Short-Term Synaptic Plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12 (1): 13–31.